

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 20 mei 2020
KENMERK CGM/200520-03
ONDERWERP Advies omlaagschaling werkzaamheden met gg-cellijnen met HIV-constructen

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 20-065_2.8-000 getiteld 'Downgrading cell lines with HIV constructs', ingediend door het Erasmus MC, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de mogelijkheid tot omlaagschaling van werkzaamheden met een aantal genetisch gemodificeerde (gg-)cellijnen die verkregen zijn door cellijnen te transduceren met constructen die afgeleid zijn van het *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1). De gg-cellijnen, J-lat cellen genoemd, bevatten een klein deel van het HIV genoom, of het bijna volledige HIV genoom met een frameshiftmutatie, waardoor het envelopeiwit niet geproduceerd wordt. De aanvrager verzoekt om de voorgenomen werkzaamheden met deze gg-cellijnen uit te mogen voeren op inperkingsniveau II, waarbij aanvullende maatregelen worden gehanteerd.

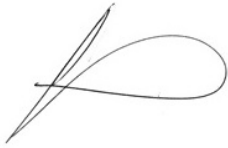
Voor een eventuele omlaagschaling moet onder meer de kans op het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus (RCL) in ogenschouw genomen worden.

De COGEM acht de kans op RCL in de cellijnen die een deel van het HIV-genoom bevatten, verwaarloosbaar klein. Voor deze cellijnen acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein wanneer de voorgenomen werkzaamheden op ML-II plaatsvinden. Voor de cellijnen met het bijna volledige HIV genoom kan niet volledig uitgesloten worden dat er RCL ontstaat. Echter de door de aanvrager voorgestelde aanvullende maatregelen zijn afdoende om ook bij aanwezigheid van RCL de veiligheid voor mens en milieu te waarborgen. De COGEM is van oordeel dat bij de uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden in het speciaal toegewezen ML-II+ laboratorium, waarbij de door de aanvrager voorgestelde aanvullende maatregelen in acht worden genomen, de risico's van de werkzaamheden met de cellijnen met het bijna volledige HIV genoom 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,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. - Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
 DG Milieu en Internationaal

Met het oog op eventuele belangenverstremeling is COGEM lid dr. S. Herfst niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Omlaagschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerde cellijnen met HIV-1 constructen

COGEM advies CGM/200520-03

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van een aantal genetisch gemodificeerde (gg-)cellijnen die verkregen zijn met verschillende van *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1) afgeleide constructen (IG 20-065), afkomstig van het Erasmus Medisch Centrum. Deze aanvraag maakt onderdeel uit van een breder HIV-onderzoeksproject, maar de adviesvraag betreft alleen de handelingen met de gg-cellijnen. Genetische modificatie van de cellijnen met HIV-afgeleide vectoren leidt, op basis van de pathogeniteitsklasse van HIV-1 en de gebruikte vectoren, tot een inschaling op inperkingsniveau ML-III. De onderzoekers verzoeken de werkzaamheden plaats te laten vinden in een speciaal toegewezen ML-II laboratorium waar aanvullende voorschriften worden gehanteerd. Werkzaamheden met lentivirale productiesystemen en vectoren kunnen in aanmerking komen voor omlaagschaling als voldaan wordt aan bepaalde voorwaarden.¹ De aspecten die in het onderhavige advies hierbij een rol spelen, betreffen de afwezigheid van replicatiecompetent lentivirus (RCL) en, voor een deel van de cellijnen, de stabiliteit van een frameshiftmutatie in het envelopeiwit van HIV.

2. HIV-1

Het *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1) behoort tot het genus *Lentivirus* binnen de familie van de *Retroviridae*. HIV bezit een positief enkelstrengs RNA genoom, dat is ingepakt in capsid-eiwitten en wordt omhuld door een lipidenmembraan (de envelop). Het genoom van HIV-1 bevat naast de genen *gag*, *pol* en *env* een viertal accessoire genen (*vif*, *vpr*, *vpu* en *nef*) en twee regulatoire genen (*tat* en *rev*).² Het lentivirale genoom bevat aan weerszijden zogenaamde Long Terminal Repeats (LTRs) die betrokken zijn bij replicatie, transcriptie, en de integratie van het provirale DNA in het gastheergenoom.

Het tropisme van lentivirussen wordt bepaald door het virale envelop-eiwit (Env), dat is ingebed in het lipidemembraan. *In vivo* infecteert HIV T-lymfocyten, macrofagen en waarschijnlijk ook dendritische cellen via CD4 als primaire receptor en CCR5 (of voor sommige HIV varianten CXCR4) als co-receptor.³ De infectie van deze CD4+ immuuncellen leidt tot replicatie en verspreiding van HIV en kan leiden tot de aftakeling van het immuunsysteem en het immuundeficiëntiesyndroom 'AIDS' veroorzaken.⁴ De transmissie van HIV vindt voornamelijk plaats via seksueel contact, via bloed, en van moeder op kind. Besmetting door niet-seksueel contact en blootstelling aan speeksel van geïnfecteerde personen is uitgesloten.⁵

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens werkzaamheden uit te voeren met gg-Jurkat cellen. Jurkat cellijnen zijn afkomstig van humane T-lymfocyten. De gg-Jurkat cellen waar in onderhavige aanvraag mee gewerkt zal worden, zijn getransduceerd met lentivirale vectoren vervaardigd met een 2^e generatie lentiviraal vectorsysteem, of getransduceerd met een HIV-1 moleculaire kloon waarbij een frameshiftmutatie in

het *env* gen aanwezig is.^{6,7} De verkregen cellijnen waarin het vectorgenoom latent^a aanwezig is, worden J-lat cellen genoemd. Het betreft hier:

- J-lat cellijnen A72, D en E, gegenereerd door transductie van Jurkat cellen met een van HIV-1 afgeleide 5'LTR-GFP-3'LTR vector die gepseudotypeerd is met het glycoproteïne (G)-eiwit van het Vesicular stomatitis virus (VSV) en het open leesraam (ORF) van het 'green fluorescent protein' (GFP) bevat;⁸
- J-lat cellijnen A2 en H2, gegenereerd door transductie van Jurkat cellen met een van HIV-1 afgeleide 5'LTR-Tat IRES-GFP-3'LTR VSV-G gepseudotypeerde vector die zowel het Tat als het GFP ORF bevat;⁹
- J-lat cellijnen 11.1, 6.3, 15.4, 8.4 en 9.2, gegenereerd door transductie van Jurkat cellen met een 'full-length' HIV-1 moleculaire kloon (HIV-R7/E-/GFP) die een frameshiftmutatie bevat in het HIV-1 *env* gen en gepseudotypeerd is met VSV-G, en waarbij het *nef* gen is vervangen door een GFP ORF.¹⁰ Door de frameshiftmutatie in *env* komt het envelopeiwit niet tot expressie, waardoor deze cellijnen geen virulent HIV kunnen vormen.

Om deze cellijnen waarin het HIV genoom latent aanwezig is te selecteren, wordt na transductie met één van de HIV-constructen tijdens een eerste selectieronde geselecteerd op cellen waarbij GFP niet tot expressie komt. Deze cellen kunnen niet getransduceerd zijn, of cellen betreffen waarin het provirale DNA niet actief afgeschreven wordt, en dus latent aanwezig is. Om hieruit de latente cellen te selecteren, wordt transcriptie van het vectorgenoom gestimuleerd door behandeling met tumor necrosis factor α (TNF- α) waardoor GFP tot expressie komt, en worden de cellen die na stimulatie GFP positief zijn, geselecteerd.⁷

De handelingen die de aanvrager wil gaan uitvoeren met de J-lat cellijnen betreffen, naast het kweken van de cellijnen, het centrifugeren en wassen, fixeren en lyseren van cellen, sonicatie van de cellen voor chromatine-immunoprecipitatie (ChIP) en 'pull-down' experimenten, en het vortexen van de cellen voorafgaand aan 'flow cytometry' cel sortering met een 'fluorescence-activated cell sorter' (FACS). Het is uit de aanvraag niet duidelijk of de aanvragers transcriptie willen induceren.

De onderzoekers verzoeken de werkzaamheden met deze gg-cellijnen plaats te laten vinden in een speciaal toegewezen ML-II+ laboratorium waar niet met wildtype HIV gewerkt wordt en aanvullende voorschriften worden gehanteerd, zoals:

- Algemene kledinginstructies: geen open schoenen, geen onbedekte benen, geen sieraden etc. op handen en armen.
- Specifieke kledinginstructies, waarbij een schort ('surgical gown') en twee paar handschoenen (waarvan 1 paar met lange mouwen) verplicht zijn, en daarnaast ten alle tijden gezichtsbescherming ('face shield') wordt gedragen.

^a Onder latent wordt in deze zin bedoeld dat het provirale DNA wel geïntegreerd is in het gastheergenoom, maar niet actief tot expressie komt.

- Alle experimenten worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet van klasse II. Alleen de bereiding van reagentia mag op de werkbank uitgevoerd worden;
- In het lab mag niet met scherpe objecten (zoals naalden) gewerkt worden.

4. Eerder COGEM advies

De gebruikte virale vectoren zijn afgeleid van HIV-1, een virus uit pathogeniteitsklasse 3. De COGEM heeft in het verleden vaker geadviseerd over de omlaagschaling van werkzaamheden met lentiviraal getransduceerde cellen, maar meestal betrof het hier 3^e generatie (SIN) lentivirale vectoren.^{e.g., 11,12}

In 2009 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over handelingen met lentivirale vectoren.¹ Hierin heeft zij aangegeven dat omlaagschaling naar ML-II mogelijk is, indien de vectorbatch die gebruikt is voor transductie van de cellen negatief is getest op aanwezigheid van RCL en de volgende aanvullende voorwaarden gehanteerd worden:

- Tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
- Open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd;
- De te transduceren cellen dienen vrij te zijn van lentivirussen met een relevant tropisme voor de gastheercel;
- Tussen handelingen met replicatie-competente lentivirussen of andere lentivirale vectorsystemen en handelingen met de lentivirale vector in hetzelfde veiligheidskabinet dient een marge van minimaal 30 minuten gehanteerd te worden.

5. Overweging en advies

In de onderhavige aanvraag wordt verzocht werkzaamheden met J-lat cellijnen uit te voeren op een lager inperkingsniveau. Mogelijke risico's die bij deze overweging een rol spelen betreffen de mogelijke aanwezigheid van replicatie competent lentivirus (RCL) en de kans op herstel van de frameshiftmutatie in het *env* gen van het 'full-length' HIV-1 vectorgenoom.

In de overwegingen moet een onderscheid gemaakt worden tussen J-lat cellijnen met een minimaal HIV-1 genoom (J-lat cellijnen A72, D, E, A2 en H2), en J-lat cellijnen met een bijna volledig HIV-1 genoom en een frameshift mutatie in het *env* gen (cellijnen 11.1, 6.3, 15.4, 8.4 en 9.2).

De aanvrager stelt dat de J-lat cellijnen wereldwijd gebruikt worden voor onderzoek naar de latente aanwezigheid van HIV en dat hiermee in andere landen in BSL-2 faciliteiten gewerkt wordt. Volgens de aanvrager is er tot op heden geen bewijs gevonden dat er infectieuze virusdeeltjes gevormd worden of reversie optreedt (bij de cellijnen met de *env* frameshiftmutatie). De aanvrager stelt dat de J-lat cellijnen geen actieve transcriptie hebben van het vectorgenoom, waardoor de kans op de productie van RCL verwaarloosbaar klein wordt geacht. De moleculaire constructen die gebruikt zijn om de Jurkat cellen te transduceren, missen een groot deel van het HIV genoom (J-lat cellijnen A72, D, E, A2 en H2), of dragen geen (functioneel) *env* bij zich. Eventueel gevormde virale deeltjes uit cellijnen met het full-length HIV construct zullen volgens de aanvrager incompleet en niet-infectieus zijn door het ontbreken van de virale envelopeiwitten.

De COGEM merkt op dat J-lat cellijnen vervaardigd met de minimale vectoren 5'LTR-GFP-3'LTR en 5'LTR-Tat IRES-GFP-3'LTR (J-lat cellijnen A72, A2, H2, D en E) veel gebruikt worden in laboratoria, en er bij deze cellijnen tot op heden nooit melding gemaakt is van aanwezigheid van infectieuze lentivirusdeeltjes. Eventueel aanwezig infectieus lentivirus zal in deze cellen een lytische infectie veroorzaken die zichtbaar zal zijn en dus opgemerkt zal worden. De COGEM acht de kans op de vorming van RCL in deze cellen met een minimaal HIV genoom verwaarloosbaar klein, en zij is van oordeel dat een RCL test (in dit geval een TZM-bl assay) voor deze cellen dan ook niet nodig is.

Van de J-lat cellijnen verkregen door transductie met het HIV-R7/E-/GFP construct (J-lat cellijnen 11.1, 6.3, 15.4, 8.4 en 9.2) is bekend dat deze incomplete virusdeeltjes kunnen uitscheiden.¹⁰ Hoewel deze cellijnen als modelsysteem fungeren voor latente HIV infecties, is transcriptie niet geheel stilgelegd.

Om de eventuele aanwezigheid van RCL aan te tonen in een aantal J-lat cellijnen heeft de aanvrager experimentele gegevens aangeleverd op basis van een 'TZM-bl reporter cell line assay'. De aanvrager wijkt hierbij af van de eerder door de COGEM voorgestelde P24 ELISA assay.¹ De TZM-bl cellen brengen de CD4, CCR5 en CXCR4 receptoren tot expressie waar HIV-1 aan kan binden om de cel te infecteren. Ook bevatten deze cellen een kopie van het β -galactosidase (β -gal) gen die onder de controle staat van een HIV-1 LTR promotor en geactiveerd kan worden door HIV-1 Tat.^{13,14} De TZM-bl reporter cell line assay wordt veelvuldig gebruikt bij onderzoek naar neutraliserende antilichamen tegen HIV-1.^{e.g., 15,16,17}

De aanvrager heeft experimentele gegevens aangeleverd waarbij een 'X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) staining assay' in TZM-bl cellen is toegepast voor de cellijnen J-Lat A72, D, A2, 11.1, en 8.4. Hiervoor is kweeksupernatant van deze J-lat cellijnen (die ongestimuleerd, of gestimuleerd zijn geweest met 'phorbol myristate acetate' (PMA) om HIV-1 transcriptie te induceren) toegevoegd aan TZM-Bl cellen. Wanneer TZM-Bl cellen door een Tat-producerende RCL of HIV geïnfecteerd worden, produceren zij β -galactosidase waardoor de cellen blauw kleuren na behandeling met X-gal kleuroplossing. In de assay werd voor het supernatant van de J-Lat A72, D, A2, 11.1 en 8.4 geen blauwe kleur waargenomen.

J-lat cellijnen verkregen door transductie met het HIV-R7/E-/GFP construct bevatten een frameshiftmutatie in het *env* gen. In de vergunningaanvraag worden verschillende argumenten aangevoerd waarom de kans op reversie van de frameshiftmutatie in het *env* gen van het HIV-R7/E-/GFP vectorgenoom extreem klein of verwaarloosbaar zou zijn. Zo stelt de aanvrager dat de mutatie alleen hersteld kan worden als er in hetzelfde gen opnieuw een frameshiftmutatie optreedt (hiervoor is minstens een deletie van 2 nucleotiden of insertie van 1 nucleotide nodig), en dat frameshiftmutaties voornamelijk voorkomen op repetitieve sequenties, zoals microsatellieten,¹⁸ die niet aanwezig zijn in het *env* gen van HIV. Ook wordt de kans op een herstel van de frameshiftmutatie laag geacht, omdat het provirale genoom geïntegreerd is het gastheergenoom en daarmee dezelfde mutatiekans heeft als het gastheergenoom. Onderzoek naar de frequentie van nucleotidesubstituties in Jurkat cellijnen wijst uit dat het gemiddelde aantal mutaties per cel en per generatie $6,7 \times 10^{-6}$ is.¹⁹ De kans op inserties en deleties is niet bepaald, maar hiervan wordt door de aanvrager verondersteld dat dit minder frequent voorkomt.²⁰ Ook worden de cellijnen maximaal 30 dagen gepasseerd.

De COGEM merkt op dat de kans op reversie niet direct nauwkeurig kan worden op basis van de mutatiekans van het chromosomale DNA. Om hier meer inzicht in te verkrijgen zou kans op reversie experimenteel bepaald dienen te worden. De COGEM is van oordeel dat de kans op herstel van de frameshiftmutatie zeer klein is omdat hiervoor een specifieke mutatie nodig is, maar zij kan de kans op een reversie ook niet geheel uitsluiten, aangezien het grote aantallen cellen betreft. Wanneer het *env* gen een herstelde functionaliteit krijgt, kan er door restende transcriptie-activiteit een RCL ontwikkelen dat kan repliceren in de J-lat cellijnen.

De door de aanvrager gebruikte TZM-bl assay acht zij niet toereikend om RCL aan te tonen, aangezien de gevoeligheid niet voldoende is om een enkel infectieus virus te kunnen detecteren, bijvoorbeeld wanneer RCL pas ontstaat bij latere passages. Daarnaast kan de TZM-bl assay, of een andere RCL test, niet uitsluiten dat reversie in de toekomst kan optreden bij het kweken van de cellen.

De COGEM merkt echter op dat het ontstaan van een eventueel RCL door herstel van het *env* gen geattenuerd zal zijn, omdat in het vectorgenoom het *nef* gen ontbreekt en vervangen is door het GFP ORF. Daarnaast kan HIV in het laboratorium alleen overgedragen worden door snij- en prikincidenten. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden op een separaat ML-II+ laboratorium uit te voeren met aanvullende voorschriften die specifiek toegesneden zijn om overdracht van HIV te voorkomen, met als voornaamste maatregel dat er niet met scherpe voorwerpen gewerkt mag worden. Gezien de transmissieroutes van HIV is de COGEM van oordeel dat deze aanvullende maatregelen een goede inperking van de risico's bieden.

6. Conclusie

De COGEM acht de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden met J-lat cellijnen vervaardigd met de minimale vectoren 5'LTR-GFP-3'LTR en 5'LTR-Tat IRES-GFP-3'LTR (J-lat cellijnen A72, A2, H2, D en E) verwaarloosbaar klein, en kan daarmee instemmen met het verzoek van de aanvrager voor omlaagschaling naar inperkingsniveau II van de werkzaamheden. Een RCL test acht zij voor deze cellijnen niet noodzakelijk.

Voor de J-lat cellijnen verkregen door infectie met het HIV-R7/E-/GFP construct (J-lat cellijnen 11.1, 6.3, 15.4, 8.4 en 9.2) is de COGEM van oordeel dat reversie van de frameshiftmutatie niet geheel uitgesloten kan worden, en dat de TZM-bl assay onvoldoende uitsluitel geeft over de afwezigheid van RCL. Echter, de COGEM is van oordeel dat bij de uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden in een speciaal toegewezen ML-II+ laboratorium, waarbij de door de aanvrager voorgestelde aanvullende maatregelen in acht worden genomen, de risico's van de werkzaamheden met J-lat cellijnen 11.1, 6.3, 15.4, 8.4 en 9.2 voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Samenvattend kan de COGEM instemmen met de door de aanvrager voorgestelde omlaagschaling van de werkzaamheden naar ML-II+.

Referenties

1. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. COGEM advies CGM/090331-03
2. Goff SP (2013). Chapter 47: Retroviridae. In: Fields Virology, Volume 2, 6th edition. Eds. Knipe DM and Howley PM, Philadelphia, PA, USA. Lippincott Williams & Wilkins
3. Clapham PR & McKnight A (2001). HIV-1 receptors and cell tropism. Br. Med. Bull. 58: 43-59
4. Freed EO & Martin MA (2013) Chapter 49: Human Immunodeficiency viruses: Replication. In: Fields Virology, Volume 2, 6th edition. Eds. Knipe DM and Howley PM, Philadelphia, PA, USA. Lippincott Williams & Wilkins
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). HIV Transmission. <https://www.cdc.gov/hiv/basics/transmission.html> (bezocht: 13 mei 2020)
6. Jordan A *et al.* (2001). The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. The EMBO Journal, 20: 1726-1738
7. Jordan A *et al.* (2003). HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. The EMBO Journal 22: 1868-1877
8. NIH AIDS Reagent Program. Reagent Information: J-Lat GFP Cells (A72). https://www.aidsreagent.org/pdfs/ds9856_002.pdf (bezocht: 7 mei 2020)
9. NIH AIDS Reagent Program. Reagent Information: J-Lat Tat-GFP Cells (A2). https://www.aidsreagent.org/reagentdetail.cfm?t=cell_lines&id=453 (bezocht: 7 mei 2020)
10. NIH AIDS Reagent Program. Reagent Information: J-lat Full Length Cells (9.2). https://www.aidsreagent.org/reagentdetail.cfm?t=cell_lines&id=69 (bezocht: 7 mei 2020)
11. COGEM (2004). Handelingen met lentivirale getransduceerde cellen in een ruimte zonder inperking. COGEM advies CGM/041103-01
12. COGEM (2005). Handelingen met lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen. COGEM advies CGM/051215-01
13. Sanyal A *et al.* (2017). Novel assay reveals a large, inducible, replication-competent HIV-1 reservoir in resting CD4⁺ T cells. Nat. Med. 23: 885-889
14. Xing L *et al.* (2016). Comparison of three quantification methods for the TZM-bl pseudovirus assay for screening of anti-HIV-1 agents. J. Virol. Methods 233: 56-61
15. Platt EJ *et al.* (2009). Evidence that ecotropic murine leukemia virus contamination in TZM-bl Cells does not affect the outcome of neutralizing antibody assays with *Human immunodeficiency virus type 1*. J. Virol. 83: 8289-8292
16. Polonis VR *et al.* (2008). Recent advances in the characterization of HIV-1 neutralization assays for standardized evaluation of the antibody response to infection and vaccination. Virology 375: 315-320
17. Sarzotte-Kelsoe M *et al.* (2014). Optimization and validation of the TZM-bl assay for standardized assessments of neutralizing antibodies against HIV-1. J. Immunol. Methods 409: 131-146
18. Ellegren H (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nat. Rev. Genet. 5: 435-445
19. Seshadri R *et al.* (1987). Mutation rate of normal and malignant human lymphocytes. Cancer Res. 47: 407-409

20. Lynch M (2010). Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation. PNAS, 107: 961-968