

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


DATUM 13 juli 2020
KENMERK CGM/200713-01
ONDERWERP Vervolgadvies over omlaagschaling werkzaamheden met gg-cellijnen met HIV-constructen

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een recent advies van de COGEM (CGM/200520-03) over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-)cellijnen die vervaardigd zijn door transductie met constructen afgeleid van het *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1) is door Bureau GGO een aanvullende adviesvraag (COG 20-001_000) gesteld.

Het advies van de COGEM betreft de omlaagschaling van werkzaamheden met de volgende gg-cellijnen:

- J-lat cellijnen A72, D en E, gegenereerd door transductie van Jurkat cellen met een van HIV-1 afgeleide 5'LTR-GFP-3'LTR niet-zelfinactiverende (niet-SIN) vector verkregen met een 2^e generatie lentiviraal vectorsysteem, 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;
- 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 niet-SIN, VSV-G gepseudotypeerde vector verkregen met een 2^e generatie lentiviraal vectorsysteem, die zowel het Tat als het GFP ORF bevat;
- 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. Door de frameshiftmutatie in *env* komt het envelopeiwit niet tot expressie, waardoor deze cellijnen geen virulent HIV-1 kunnen vormen.



De aanvullende adviesvraag omvat een drietal vragen, betreffende een verdere onderbouwing van de omlaagschaling van de gg-cellen met minimaal HIV-1 genoom, de mogelijkheid tot een generieke inschaling van niet-SIN 2^e of 3^e generatie lentivirale vectoren en de noodzaak van een RCL test, en tenslotte of inschaling van werkzaamheden met J-lat cellijnen getransduceerd met de full-length HIV-1 kloon mogelijk is op inperkingsniveau II met aanvullende voorschriften.

De COGEM zal deze vragen hieronder beantwoorden en daarbij nadere toelichting geven.

Vraag 1

“Met betrekking tot J-lat cellijnen met een minimaal HIV-1 genoom (J-lat cellijnen A72, D, E, A2 en H2):

De COGEM acht de kans op RCL in de cellijnen die een deel van het HIV-genoom bevatten, verwaarloosbaar klein en zij is van oordeel dat een RCL test voor deze cellen dan ook niet nodig is.

De COGEM geeft in haar advies aan dat *de betreffende cellijnen veel gebruikt worden in laboratoria, en dat er bij deze cellijnen tot op heden nooit melding gemaakt is van aanwezigheid van infectieuze lentivirusdeeltjes*. Is de COGEM hiermee van mening dat de hierboven genoemde cellijnen op ML-II gehanteerd kunnen worden en onder het predicaat ‘langdurig veilig gebruik’ kunnen vallen? Zo ja, dan wordt de COGEM verzocht aan te geven welke gegevens zij hiertoe heeft meegenomen in haar beoordeling en of deze gegevens tevens het negatief testen op RCL van de betreffende cellijnen omvatten.”

Antwoord

De COGEM merkt op dat er een onderscheid gemaakt dient te worden tussen het produceren van gg-cellijnen en het gebruik van gg-cellijnen die in het verleden geproduceerd zijn. In de aanvraag waarop het voorgaande COGEM advies is gebaseerd, is verzocht om werkzaamheden uit te voeren met getransduceerde cellijnen en is er geen sprake van productie van deze cellijnen.

De COGEM heeft in haar advies uit 2009 gesteld dat wanneer afwezigheid van RCL is aangetoond in de vectorbatch waarmee de cellen getransduceerd zijn, de kans op aanwezigheid van RCL in de gg-cellen verwaarloosbaar klein is. Voor de betreffende aanvraag wordt gebruik gemaakt van gg-Jurkat (J-lat) cellen; dit zijn geïmmortaliseerde T-cellen, waar HIV goed op kan repliceren en cytopathische effecten als gevolg van infectie goed waarneembaar zijn. Hoewel niet te achterhalen is of de vectorbatch die in het verleden gebruikt is voor de productie van de J-lat cellen op aanwezigheid van RCL is getest, worden deze cellijnen wereldwijd al lange tijd gekweekt in laboratoria, waarbij cytopathogene effecten nooit zijn gemeld. Voor deze cellijnen zou het (veelvuldig) kweken als RCL test kunnen worden beschouwd, en ziet de COGEM geen aanleiding om deze cellijnen te onderwerpen aan een RCL test.



Vraag 2

“Is de COGEM van mening dat in het algemeen animale cellen die getransduceerd zijn met lentivirale partikels die zijn vervaardigd middels een 2e (of derde) generatie lentiviraal systeem i.c.m. een niet SIN vector veilig op ML-II gehanteerd kunnen worden? Zo ja, is zij hiermee dan tevens van mening dat de vectorbatch (2e generatie of derde generatie niet SIN) niet negatief op aanwezigheid van RCL getest hoeft te worden i.t.t. zoals gesteld in haar advies (CGM/090331-03) van 2009? De COGEM wordt verzocht dit nader toe te lichten.”

Antwoord

Vanwege de heterogeniteit van productiesystemen die als 2^e generatie systeem aangeduid worden (bijvoorbeeld door variatie in de gebruikte accessoire of regulatoire HIV genen) acht de COGEM, conform het advies uit 2009, een RCL test van de vectorbatch noodzakelijk alvorens werkzaamheden met animale cellen die getransduceerd zijn met een niet-SIN vector geproduceerd met 2^e generatie lentiviraal systeem, omlaag geschaald kunnen worden van ML-III naar ML-II niveau. Hierbij dient onderscheid gemaakt te worden tussen cellen die pas getransduceerd zijn en reeds getransduceerde cellen die al langere tijd gekweekt worden. In het voorgaande COGEM advies (CGM/200520-03), achtte de COGEM het aantonen van de aanwezigheid van RCL in de te gebruiken cellen niet noodzakelijk, omdat het hier klonaal geselecteerde cellijnen betreft met een lange geschiedenis van veilig gebruik (zie vraag 1).

Voor werkzaamheden met cellen getransduceerd met een niet-SIN vector geproduceerd met een 3^e generatie lentiviraal systeem acht de COGEM de kans op RCL vorming in de virusbatch vergelijkbaar met die van een 3^e generatie SIN vector, aangezien er nog altijd gebruik gemaakt wordt van verschillende ‘packaging’ constructen en daardoor meerdere recombinatie events vereist zijn alvorens RCL kan ontstaan. Een RCL test van de virusbatch is daarom niet noodzakelijk bij een 3^e generatie systeem, waarbij geen onderscheid gemaakt hoeft te worden tussen SIN of niet-SIN.

Vraag 3

“Met betrekking tot 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 COGEM acht de door de aanvrager gebruikte TZM-bl assay 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.*

Is de COGEM van mening dat een dergelijke HIV-1 RCL gedeleteerd voor het *nef* gen in voldoende mate geattenuerd is om gehanteerd te kunnen worden op ML-II met inbegrip van de volgende aanvullende voorschriften?

- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- Het te gebruiken gastheermateriaal is vrij van HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere lentivirussen;
- Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt en is alleen toegestaan onder condities waarbij prik- en snijaccidenten worden voorkomen (bijvoorbeeld in combinatie met kevlarhandschoenen). NB: BGGO merkt op dat het hier toepassen van het voorschrift m.b.t. 'sharps' impliceert dat dit ook voor activiteiten met genetisch gemodificeerd HIV op ML-III niveau standaard moet worden voorgeschreven.

De COGEM wordt verzocht haar antwoord toe te lichten.”


Antwoord

In haar advies over de betreffende vergunningaanvraag heeft de COGEM gesteld dat bij werkzaamheden met de cellijnen verkregen door infectie met het full-length HIV-1 construct niet uitgesloten kan worden dat door herstel van de frameshiftmutatie in het *env* gen RCL gevormd kan worden. Omdat het *nef* gen in de gebruikte vector gedeleteerd is, zal ook in eventueel gevormd RCL *nef* ontbreken. Uit onderzoek met HIV-1 is gebleken dat een *nef*-gedeleteerde variant *in vivo* minder goed kan repliceren ten opzichte van wildtype HIV en derhalve als geattenuëerd kan worden beschouwd. Indien er een *nef* gedeleteerd lentivirus gevormd wordt, kan niet geheel uitgesloten worden dat tijdens de replicatie mutaties optreden, waardoor een deel van de attenuatie verloren kan gaan.¹

In haar voorgaande advies heeft de COGEM, gezien de transmissieroute van HIV waarbij aerogene besmetting niet voorkomt, ingestemd met het inschalen van werkzaamheden met de J-lat cellen waarbij de vorming van *nef* gedeleteerd RCL niet uitgesloten is, op inperkingsniveau ML-II+, met inbegrip van de door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschriften. Hierbij worden in een separaat laboratorium maatregelen gehanteerd die vergelijkbaar zijn aan de condities waarop HIV gekweekt wordt in een ML-III laboratorium, met uitzondering van de afwezigheid van een en suite autoclaaf en onderdruk in de werkruimte. Aanwezigheid van de autoclaaf en onderdruk leveren echter geen bijdrage aan een verdere inperking van werkzaamheden met HIV.

Alles in overweging nemende acht de COGEM de door BGGO genoemde aanvullende voorschriften op inperkingsniveau II toereikend voor werkzaamheden met een *nef* gedeleteerd RCL, maar adviseert als aanvullende voorschriften op te nemen dat (1) de werkzaamheden in een separate ruimte (met toegangsdeur) worden uitgevoerd, waar alle gebruikers de aanvullende voorschriften volgen en waar geen werkzaamheden mogen plaatsvinden met wildtype of mutante lentivirussen, alsmede vector of donor sequenties die de *env* of *nef* defecten kunnen herstellen of complementeren, en (2) dat al het biologisch afval wordt

¹ Das AT & Berkhout B (2016). Conditionally replicating HIV and SIV variants. *Virus Res.* 216: 66-75



verzameld en opgeslagen in breukvaste, lekdichte containers of een gelijkwaardige verpakking die in de werkruimte afgesloten worden alvorens deze afgevoerd worden. De COGEM beschouwt het vermijden van het gebruik van sharps als standaardvoorschrift voor werkzaamheden met HIV en lentivirale vectoren.

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