

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 11 oktober 2023
KENMERK CGM/231011-02
ONDERWERP Advies Inschaling werkzaamheden met VEEV-replicon met geïnactiveerd HIV-Env

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld “Toevoeging van werkzaamheden met replicons afgeleid van het *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) aan GGO IG 15-226_Ik met als titel “Biomedisch Onderzoek op het AMC”” (IG 17-209_2.8-002) van het Academisch Medisch Centrum (AMC), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met replicons afgeleid van het *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) waarin een aangepast *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-) env-gen als transgen wordt gebruikt. Door de aanpassingen is het HIV env-transgen inactief. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden uit te mogen voeren op inperkingsniveau I. Omdat een deel van de experimenten niet omschreven wordt, adviseert de COGEM enkel over de experimenten waarvan een beschrijving is aangeleverd.

De aanvrager beschrijft de verschillende aanpassingen (mutaties, deleties, inserties) die in functionele domeinen gemaakt zijn om het HIV-Env te inactiveren, en onderbouwt de inactivatie met literatuurgegevens. De COGEM is van oordeel dat deze combinatie van mutaties leidt tot een niet-functioneel Env-eiwit.

De COGEM is eveneens van oordeel dat de milieurisico's van eventueel, door de aanwezigheid van een retroviraal envelopeiwit, gevormde ‘virus like vesicles’ (VLV's) verwaarloosbaar klein zijn.

Concluderend is zij van oordeel dat de *in vitro* werkzaamheden op ML-I plaats kunnen vinden, onder de voorwaarde dat het gastheermateriaal geen verwante alfavirussen bevat en geen cellen van paarden of paardachtigen gebruikt worden. Op dit inperkingsniveau zijn de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.



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.
- Drs. Y de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM lid dr. A.T. Das niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inschaling werkzaamheden met een *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV)-replicon met geïnactiveerd HIV Envelop als transgen

COGEM advies CGM/231011-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een replicon afgeleid van de *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) vaccinstam TC-83 waarbij een aangepast *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-) enveloppen (*env*) als transgen wordt gebruikt (IG 17-209). Door de aanpassingen is het Env-eiwit functioneel inactief geworden. De aanvrager, het Academisch Medisch Centrum (AMC), wil met deze VEEV-replicons *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden uitvoeren op respectievelijk ML-I en D-I. De COGEM is gevraagd of op basis van de aangeleverde informatie de kans op vorming van infectieuze virus-like vesicles (VLV's) verwaarloosbaar klein is, en of zij kan instemmen met de voorgestelde inperkingsniveau's.

2. *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV)

VEEV is één van de 32 soorten die behoort tot het genus *Alphavirus* (Familie: *Togaviridae*).^{1,2} VEEV kan milde tot ernstige ziekte veroorzaken in paardachtigen, variërend van koorts tot ernstige encefalitis, en kan daarnaast ook ziekte veroorzaken bij de mens. Het virus wordt voornamelijk verspreid via muggen behorende tot de *Culex* subgenus *Melanoconion* spp.³

Het VEEV bevat een positief enkelstrengs RNA-genoom van ongeveer 11,4 kb.³ Op het genoom liggen twee grote 'open reading frames' (ORF's); replicatie van het genoom vindt plaats in het cytoplasma van de gastheercel. De niet-structurele eiwitten (nsP1-4) zijn betrokken bij replicatie van het virale RNA en worden als een polyproteïne afgelezen van het ORF aan het 5'-uiteinde van het genoom. Na klieving door het virale protease nsP2 worden individuele eiwitten gevormd.^{4,5} Het ORF aan het 3'-uiteinde van het genoom codeert voor de structurele eiwitten. Dit ORF komt tot expressie vanaf een subgenomisch mRNA, dat getranscribeerd wordt vanaf een interne promotor, 26S, gelegen in het gebied tussen het structurele en niet-structurele ORF.^{3,5} Virale en cellulaire proteases klieven de structurele polyproteïnes in de individuele eiwitten (C, E3, E2, 6K en E1). In sommige gevallen leidt '(-1) frame-shifting' tijdens de translatie tot de productie van een extra viraal trans-frame (TF) eiwit.⁶ Aan beide uiteinden van het genoom liggen de 'non-coding regions', en het virale RNA heeft een 5'-cap-structuur en een poly-A-staart aan het 3'-uiteinde.

Het RNA in het virusdeeltje wordt omgeven door het capsid-eiwit (C) en tezamen vormen deze het nucleocapsid. Om de eiwitmantel bevindt zich een lipidenmembraan met daarin de glycoproteïnen (envelopeiwitten, E1 en E2) die betrokken zijn bij de aanhechting en infectie van de gastheercel.⁷ De glycoproteïnen zijn daarmee direct van invloed op het gastheerbereik.³ De assemblage en 'budding' van nieuwe virusdeeltjes vindt plaats op het plasmamembraan van de gastheercel.⁸

Door de virulente VEEV stam *Trinidad donkey* 83 keer in hartcellen van cavia's te passeren, is VEEV TC-83 geproduceerd. Deze levend verzwakte vaccinstam is als veterinair vaccin toegelaten in de Verenigde Staten van Amerika.⁹ Deze vaccinstam wordt ook onder een 'Investigational New Drug protocol' van de Amerikaanse 'Food and Drug Administration' (FDA) toegediend aan laboratorium- en veldmedewerkers die het risico lopen geïnfecteerd te worden met een virulente stam van VEEV.¹⁰ Het genoom van het geattenueerde virus is op 12 plaatsen gemuteerd.^{11,12} De verzwakking van het gemuteerde virus berust op 2 van deze 12 mutaties: de eerste gelegen in de 5' non-coding regio en de tweede in structureel eiwit E2.^{12,13} Reversie naar wildtype VEEV is niet uitgesloten.¹⁴

3. Human immunodeficiency virus 1

Human immunodeficiency virus 1 (HIV) behoort tot het genus *Lentivirus* en de familie *Retroviridae* (subfamilie *Orthoretrovirinae*).¹⁵ Het virus bezit een enkelstrengs RNA-genoom, dat is ingepakt in capsid-eiwitten en wordt omhuld door een lipidenmembraan, de 'envelop'. Ingebed in het lipidenmembraan zitten de envelopeiwitten die gecodeerd worden door het *env*-gen en die het gastheertropisme van het virus bepalen. Infectie van de cel wordt geïnduceerd door specifieke binding van de envelopeiwitten aan een cellulaire receptor, al dan niet in combinatie met een co-receptor. Tijdens dit proces wordt het virusdeeltje gedeeltelijk ontmanteld. In het cytoplasma wordt het virale RNA door reverse transcriptase (een virus-specifiek polymerase) omgezet in een dubbelstrengs DNA-kopie, die integreert in het genoom van de geïnfecteerde cel (provirale genoom).^{16,17}

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens werkzaamheden uit te voeren met een VEEV-repliconsysteem waarbij het HIV *env*-gen als transgen wordt gebruikt. De COGEM merkt op dat er een discrepantie bestaat in het dossier tussen het aanvraagformulier (een aanvulling op een bestaand 2.8-verzoek) en de aangeleverde bijlagen waarin de werkzaamheden apart beschreven zijn. Omdat de beschrijving van de werkzaamheden in het aanvraagformulier zeer summier is, baseert de COGEM haar advies op de werkzaamheden zoals beschreven in de aangeleverde bijlage. Dit betreft de productie en expressie van een functioneel inactief HIV Env-eiwit in twee humane cellijnen; HEK-293T en HEK-293F. Het gemodificeerde *env*-transgen, gebaseerd op het HIV subtype BG505, is in een VEEV TC-83 repliconconstruct ingevoegd op de locatie van de structurele eiwitten, samen met een gen coderend voor puromycine-resistentie. Dit VEEV-replicon zal als DNA-plasmide, waarbij replicon-RNA in de HEK-293T/F cellen wordt geproduceerd, of als *in vitro* getranscribeerd RNA in de cellen worden getransfecteerd. Door onder puromycine-selectiedruk te kweken, zullen de cellen worden geselecteerd waarbij het Env-eiwit aanwezig is op het plasmamembraan. Daarbij zullen in sommige gevallen RNA-specifieke nucleoside-analogen worden gebruikt om 'random' mutaties te induceren tijdens de replicatie. Vervolgens wordt fluorescentie-geactiveerde celsortering (FACS)-analyse gebruikt om te selecteren voor varianten die sterk aan anti-Env monoclonale antilichamen (mAb's) binden.

5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft VEEV ingeschaald in pathogeniteitsklasse 3, de vaccinstam VEEV TC-83 in pathogeniteitsklasse 2, en HIV-1 in pathogeniteitsklasse 3.¹⁸ Daarnaast heeft de COGEM meerdere keren geadviseerd over replicons afgeleid van VEEV met verschillende donorsequenties.^{o.a. 19,20,21,22}

In het advies ‘Generieke omlaagschaling van werkzaamheden met virale replicons afgeleid van alfavirussen en flavivirussen’ uit 2022,²³ adviseerde de COGEM dat laboratoriumwerkzaamheden met naakte replicons afgeleid van alfavirussen en flavivirussen, waaruit de structurele genen zijn verwijderd, kunnen plaatsvinden op inperkingsniveau I. Daarbij geldt dat er geen transgenen mogen worden gebruikt die de verwijderde functies kunnen complementeren. Met betrekking tot alfavirus replicons wordt hieronder ook verstaan: sequenties die coderen voor de envelopeiwitten van virussen uit de families *Togaviridae*, *Rhabdoviridae* en *Retroviridae*, vanwege de vorming van infectieuze VLV’s.

6. Overweging en advies

De onderhavige vergunningaanvraag betreft werkzaamheden met een functioneel inactief HIV *env*-gen als transgen in VEEV TC-83-replicons. Het gebruik van retrovirale envelopeiwitten in alfavirus repliconsystemen is eerder uitgesloten voor generieke omlaagschaling vanwege de kans op vorming van infectieuze VLV’s.²³ De COGEM is door Bureau GGO gevraagd of bij de voorgenomen werkzaamheden het HIV *env*-gen stabiel geïnactiveerd blijft, of er bij de werkzaamheden risico’s zijn met betrekking tot de vorming van VLV’s, en of zij kan instemmen met inschaling van de beschreven werkzaamheden op ML-I en D-I.

Allereerst merkt de COGEM op dat in de aanvraag niet beschreven is welke dierproeven uitgevoerd worden met de VEEV-Env replicons. In een aangeleverde bijlage waarin de experimenten worden beschreven, worden alleen *in vitro* werkzaamheden omschreven met VEEV-replicons met geïnactiveerd HIV-Env als transgen in HEK-293T en HEK-293F cellen. Echter, volgens het aanvraagformulier zou de aanvrager ook *in vitro* experimenten kunnen uitvoeren in primaire zoogdiercellen, met uitzondering van cellen van paarden en paardachtigen, en *in vivo* experimenten in ratten en muizen. Omdat niet duidelijk is welke *in vivo* werkzaamheden de aanvrager uit wil voeren met ratten en muizen, worden de dierproeven in onderhavig advies buiten beschouwing gelaten. De COGEM beperkt haar advies dus tot de *in vitro* werkzaamheden met het VEEV-replicon met het HIV-*env* als transgen in primaire zoogdiercellen, en HEK-293T en HEK-293F cellen, zoals beschreven in de bijlage en onder paragraaf 4 in onderhavig advies.

6.1 Modificaties aan HIV-Env

De aanvrager beschrijft de verschillende aanpassingen (mutaties, deleties, inserties) die zijn gemaakt in functionele domeinen om het HIV-Env te inactiveren. Deze aanpassingen omvatten verschillende puntmutaties, de deleties van het ‘membrane proximal external domain’ (MPER), het transmembraandomein en de cytoplasmatische staart, en de vervanging van het N-terminale signaalpeptide door een artificieel signaalpeptide. Door de mutaties is de fusie-activiteit van het Env-eiwit verstoord. De aanvrager onderbouwt dit met literatuurgegevens waarin de functionaliteit van de mutaties wordt aangetoond.^{24,25,26,27,28,29,30,31,32,33} Op basis van de aangeleverde informatie is de COGEM van oordeel dat deze combinaties van mutaties leiden tot een niet-functioneel Env-eiwit. De kans op herstel van de fusie-activiteit van het geïnactiveerde HIV-Env door de aanwezigheid van nucleoside-analogen (die tijdens de replicatie random mutaties kunnen induceren), acht de COGEM verwaarloosbaar klein gezien de vele mutaties, inserties en deleties die zijn aangebracht.

6.2 Mogelijkheid tot vorming VLV's

De aanvrager stelt dat er geen infectieuze VLV's kunnen ontstaan bij de *in vitro* werkzaamheden, omdat bij deze werkzaamheden geen gebruik gemaakt wordt van een functioneel retroviraal Env-eiwit. De COGEM acht het niet uitgesloten dat er 'vesicles' gevormd zullen worden waarin zich het Env-eiwit bevindt. Echter, vanwege het ontbreken van de fusie-activiteit van het HIV-Env, zal een eventueel gevormd VLV niet infectieus zijn en kan het vesiculaire replicatiecomplex niet verder verspreiden.

7. Conclusie

Alle bovenstaande overwegingen in ogenschouw nemende, concludeert de COGEM dat de kans op herstel van de fusie-activiteit van het geïnactiveerde HIV-Env bij de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden verwaarloosbaar klein is, en dat de milieurisico's van eventueel gevormde VLV's eveneens verwaarloosbaar klein zijn. Zij kan derhalve instemmen met een inschaling van de *in vitro* werkzaamheden op ML-I, op voorwaarde dat de primaire zoogdiercellen die worden gebruikt niet afkomstig zijn van paarden en paardachtigen (zoals aangegeven in de vergunningaanvraag) en vrij zijn van verwante alfavirussen en virussen uit de families *Togaviridae*, *Rhabdoviridae* en *Retroviridae* om te voorkomen dat verwijderde functies in de replicons kunnen worden hersteld door complementatie of recombinatie.

De COGEM is van oordeel dat op het genoemde inperkingsniveau en met de voorgestelde beschermingsmaatregelen, de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Venezuelan equine encephalitis virus*. https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202205111 (bezocht: 4 oktober 2023)
2. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Togaviridae*. <https://ictv.global/report/chapter/togaviridae/togaviridae> (bezocht: 4 oktober 2023)
3. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: Fields Virology, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
4. Pietilä MK *et al.* (2017). Alphavirus polymerase and RNA replication. *Virus Res.* 234: 44-57
5. Rupp JC *et al.* (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J. Gen. Virol.* 96: 2483–2500
6. Firth AE *et al.* (2008). Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. *Virol. J.* 5: 108
7. Jose J *et al.* (2009). A structural and functional perspective of Alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.* 4: 837–856
8. Elmasri Z *et al.* (2021). Alphavirus-induced membrane rearrangements during replication, assembly, and budding. *Pathogens* 10: 984

9. Guerbois *et al.* (2013). IRES-driven expression of the capsid protein of the Venezuelan equine encephalitis virus TC-83 vaccine strain increases its attenuation and safety. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7: e2197
10. Grabenstein JD *et al.* (2006). Immunization to protect the US Armed Forces: heritage, current practice, and prospects. *Epidemiol. Rev.* 28: 3-26
11. Kinney RM *et al.* (1989). The full-length nucleotide sequences of the virulent Trinidad donkey strain of Venezuelan equine encephalitis virus and its attenuated vaccine derivative, strain TC-83. *Virology* 170: 19-30
12. Kinney RM *et al.* (1993). Attenuation of Venezuelan equine encephalitis virus strain TC-83 is encoded by the 5'-noncoding region and the E2 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 67: 1269-1277
13. Kulasegaran-Shylini R *et al.* (2009). The 5'UTR-specific mutation in VEEV TC-83 genome has a strong effect on RNA replication and subgenomic RNA synthesis, but not on translation of the encoded proteins. *Virology* 387: 211-221
14. Kenney JL *et al.* (2011). Stability of RNA virus attenuation approaches. *Vaccine* 29: 2230-2234
15. International Committee on Taxonomy of Viruses. Taxonomy. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 25 september 2023)
16. Goff SP (2013). *Retroviridae*. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
17. Freed EO & Martin MA (2013). Human Immunodeficient Viruses: Replication. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
18. COGEM (2023). Actualisatie van de pathogeniciteitsclassificatielijsten met humaan- en dierpathogene DNA- en RNA-virussen (2023). COGEM advies CMG/230929-01
19. COGEM (2023). Inschaling van werkzaamheden met chimere Binjari en Palm Creek virussen (gg-BinJV en gg-PCV) en VEEV replicondeeltjes in muggen. COGEM advies CGM/230828-01
20. COGEM (2017). Werkzaamheden met gg-VEEV en gg-SPDV replicons met aquatische donorsequenties. COGEM advies CGM/171030-03
21. COGEM (2017). Werkzaamheden met gg-alphavirus-replicons (SFV, SINV en VEEV) met donorsequenties van griepvirussen, Human respiratory syncytial virus, en Marburg- en Ebolavirussen. COGEM advies CGM/171024-01
22. COGEM (2017). Omlaagschaling van in vivo en in vitro werkzaamheden met *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) replicons. COGEM advies CGM/170224-01
23. COGEM (2022). Generieke omlaagschaling van werkzaamheden met virale replicons afgeleid van alfavirussen en flavivirussen. COGEM-advies CGM/221223-01
24. Dev J *et al.* (2000). Structural basis for membrane anchoring of HIV-1 envelope spike. *Science* 3535: 172-175
25. Fernandez MV *et al.* (2020). Elucidating the basis for permissivity of the MT-4 T-cell line to replication of an HIV-1 mutant lacking the gp41 cytoplasmic tail. *J. Virol.* 94: e01334-20
26. Binley JM *et al.* (2000). A recombinant human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein complex stabilized by an intermolecular disulfide bond between the gp120 and gp41 subunits is an antigenic mimic of the trimeric virion-associated structure. *J. Virol.* 74: 627-643

27. Sanders RW *et al.* (2002). Stabilization of the soluble, cleaved, trimeric form of the envelope glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 76: 8875-8889
28. Torrents de la Peña A *et al.* (2017). Improving the immunogenicity of native-like HIV-1 envelope trimers by hyperstabilization. *Cell Rep.* 20: 1805-1817
29. Chen SS (1994). Functional role of the zipper motif region of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41. *J. Virol.* 68: 2002-2010
30. Chen SS *et al.* (1998). Mutations in the leucine zipper-like heptad repeat sequence of human immunodeficiency virus type 1 gp41 dominantly interfere with wild-type virus infectivity. *J. Virol.* 72: 4765-4774
31. McCaul N *et al.* (2021). Intramolecular quality control: HIV-1 envelope gp160 signal-peptide cleavage as a functional folding checkpoint. *Cell Rep.* 36: 109646
32. Torrents de la Peña A *et al.* (2021). Convergent HIV-1 evolution upon targeted destabilization of the gp120-gp41 interface. *J. Virol.* 95: e0053221
33. De Taeye S *et al.* (2015). Immunogenicity of stabilized HIV-1 envelope trimers with reduced exposure of non-neutralizing epitopes. *Cell* 163: 1702-1715