

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

DATUM 22 februari 2024
KENMERK CGM/240222-02
ONDERWERP Advies inschaling van werkzaamheden met geattenuerd gg-HIV-1

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 24-009_2.8-000 getiteld 'Constructie, productie en karakterisatie van recombinant geattenuerde HIV-1 vectoren', ingediend door Janssen Vaccines & Prevention B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een verzwakte genetisch gemodificeerde (gg-)HIV-1 (*Human immunodeficiency virus 1*) variant. De aanvrager is voornemens om DNA plasmiden te produceren waarin het genoom van deze gg-HIV-1 variant is opgenomen. Deze plasmiden zullen in cellen gebracht worden om een verzwakt HIV te produceren, dat vervolgens gebruikt wordt om cellen te infecteren. In deze gg-HIV variant zijn een aantal genen uitgeschakeld waardoor het virus zich minder goed kan vermeerderen.

De constructie van de plasmiden vindt plaats in bacteriën. HIV-1 vermenigvuldigt alleen in zoogdiercellen. Door de grote verschillen tussen zoogdiercellen en bacteriën is de kans verwaarloosbaar klein dat tijdens deze werkzaamheden infectieuze virusdeeltjes kunnen ontstaan. De COGEM stemt daarom in met het verzoek om deze werkzaamheden op ML-I te laten plaatsvinden. Voor de productie- en infectiewerkzaamheden acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein wanneer de voorgenomen werkzaamheden op ML-II plaatsvinden, met inachtneming van enkele aanvullende maatregelen.

De COGEM is van oordeel dat bij het uitvoeren van de voorgenomen werkzaamheden op deze inperkingsniveaus en onder navolging van de aanvullende voorschriften, de risico's 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.
- Drs. Y de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal

Inschaling van klonerings-, productie- en infectiewerkzaamheden met geattenuerd genetisch gemodificeerd HIV-1

COGEM advies CGM/240222-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren (IG 24-009) over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-)HIV-1. De aanvraag is afkomstig van Janssen Vaccines & Prevention B.V. De aanvrager is voornemens om DNA plasmiden te construeren met een recombinant geattenuerd HIV-1 proviraal genoom. Vervolgens is de aanvrager voornemens om cellen met deze DNA plasmiden te transfecteren voor de productie van replicatiecompetente geattenuerde HIV-1 deeltjes, om daarna cellen met de geproduceerde virusdeeltjes te infecteren. Het uiteindelijke doel van het onderzoek is deze virusdeeltjes als positieve controle te gebruiken in een te ontwikkelen test op de aanwezigheid van replicatiecompetent lentivirus (RCL). De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met deze kloneringswerkzaamheden op ML-I en de productie- en infectiewerkzaamheden op ML-II met inachtneming van enkele aanvullende voorschriften.

2. Achtergrondinformatie over het lentivirus HIV-1

HIV-1 (*Human immunodeficiency virus 1*) is een enkelstrengs RNA-virus en behoort tot de familie van retrovirussen (*Retroviridae*, genus *Lentivirus*). Lentivirussen kunnen hun virale genoom in het genoom van de gastheercel integreren. Het genoom bevat drie structurele genen (*gag*, *pol* en *env*), twee essentiële regulatoire genen (*tat* en *rev*), een viertal accessoire genen (*vif*, *vpr*, *vpu* en *nef*)¹, een packagingsignaal (Ψ), Rev-responsive element (RRE) en aan weerszijden een zogenaamde 'Long Terminal Repeat' (LTR).

Het genoom is ingepakt in capsid-eiwitten (gecodeerd door het *gag* gen) en wordt omhuld door een lipidenmembraan, de zogenoemde 'envelop'. In de envelop bevinden zich envelopeiwitten (gecodeerd door het *env* gen) die het gastheertropisme van het virus bepalen. Het derde structurele gen *pol*, codeert voor een virus-specifiek polymerase: het reverse transcriptase (RT) dat het virale RNA omzet naar dubbelstrengs DNA.^{2,3} Dit wordt het provirale genoom genoemd. Daarnaast codeert *pol* ook voor het enzym integrase, dat het provirale genoom integreert in het DNA van de geïnfecteerde cel. De transcriptiemachinerie van de gastheercel zorgt voor de synthese van viraal RNA vanaf het geïntegreerde provirale DNA.

Het regulatoire *tat* gen codeert voor het Tat eiwit, dat noodzakelijk is om de transcriptie te activeren. Het *rev* gen codeert voor een eiwit dat aan het RRE in het virale RNA bindt en een belangrijke rol heeft in de export van dit RNA van de kern naar het cytoplasma. Voor de binding van het capsid-eiwit met het virale RNA en de uiteindelijke vorming van virusdeeltjes is het packagingsignaal Ψ in het RNA essentieel.

De accessoire genen zijn *in vitro*, i.e., in virus-cel cultures in het laboratorium, niet essentieel voor virusreproductie, maar *in vivo* spelen ze een belangrijke rol in de virulentie. Deze eiwitten spelen een rol bij het onderdrukken van de immuunrespons in de gastheer.^{3,4,5} Zonder de accessoire genen kunnen deze

lentivirussen niet efficiënt repliceren in de mens (HIV-1 en HIV-2) of apen (SIV).³ De precieze functie van de verschillende accessoire eiwitten is echter nog niet geheel duidelijk.

3. Voorgenomen werkzaamheden

3.1 Construeren van HIV-1 proviraal-genoom bevattende plasmiden

De aanvrager is voornemens om door middel van recombinant DNA technieken, waaronder kloneren in *Escherichia coli* K-12, proviraal-genoom bevattende plasmiden te maken. Voor de constructie wordt gebruik gemaakt van *de novo* gesynthetiseerde genoomfragmenten afkomstig van een 'gene synthesis service provider'. Hiermee zal een synthetisch HIV-1 proviraal genoom geconstrueerd worden dat dezelfde attenuerende mutaties en deleties bevat als de HIV-variant R8.71. R8.71 is eerder beschreven als een positieve controle bij een RCL test.⁶ De accessoire genen *vif*, *vpr*, *vpu* en zijn uitgeschakeld door deleties en het accessoiregen *nef* door een puntmutatie, hierdoor ontstaat een replicatiecompetente gg-HIV-1 variant. Door de deleties en mutaties in de accessoire genen neemt de replicatiecapaciteit van het gg-HIV af resulterend in een gg-HIV-1 met een geattenuerd fenotype.^{7,8,9,10}

3.2 Productie van geattenuerde gg-HIV-1 partikels

Om geattenuerde gg-HIV-1 deeltjes te produceren, zullen cellijnen (HEK293, HEK293T en PER.C6) getransfecteerd worden met de eerder geconstrueerde plasmiden. Hierbij gaat het om kleinschalige virusproducties met maximaal 100 ml cultuurvloeistof per experiment.

3.3 Infectie van cellen met de geproduceerde gg-HIV-1 partikels

De geproduceerde virusdeeltjes zullen tenslotte gebruikt worden om cellen te infecteren. Hierbij gaat het naast de bovengenoemde HEK293, HEK293T, PER.C6 cellen om een aantal geïmmortaliseerde cellijnen zonder virale onderdelen (A549, MRC-5, CHO en BHK-21) en humane perifere mononucleaire bloedcellen (PBMCs).

3.4 Voorstel inschaling werkzaamheden

De aanvrager verzoekt om omlaagschaling van de kloneringswerkzaamheden (constructie van plasmiden) naar ML-I en stelt daarbij voor om de standaard ML-I werkvoorschriften te hanteren. Daarnaast verzoekt de aanvrager om omlaagschaling van de productie- en infectiewerkzaamheden naar ML-II, waarbij naast de standaard ML-II werkvoorschriften ook als aanvullende voorschrift (voor activiteiten met genetisch gemodificeerde micro-organismen die infectieus zijn via wondjes van de huid) zal worden gehanteerd:

- tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen

Bureau GGO heeft voor de werkzaamheden op ML-I geen aanvullende voorschriften voorgesteld. Voor de werkzaamheden op ML-II zijn door BGGO de volgende aanvullende voorschriften opgesteld:

- Het is niet toegestaan om gelijktijdig werkzaamheden uit te voeren met wildtype of mutante lentivirussen, dan wel met vector- of donorsequenties die HIV *vif*, *vpr*, *vpu* en *nef* gendefecten kunnen herstellen of complementeren.

- 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).

4. Eerder COGEM advies

HIV is een virus uit pathogeniteitsklasse 3.¹¹ Genetische modificatie van 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 COGEM heeft in 2021 een generiek advies uitgebracht over handelingen met lenti- en retrovirale vectoren en hiermee getransduceerde cellen.¹² Hierin heeft zij geadviseerd dat werkzaamheden met productie van lentivirale vectoren of hiermee getransduceerde cellen op ML-I kunnen plaatsvinden, mits hierbij geen RCL gevormd kan worden. In de onderhavige aanvraag wordt echter gebruik gemaakt van een geattenuerd replicatiecompetent HIV.

In 2020 heeft de COGEM geadviseerd over de omlaagschaling van werkzaamheden met een aantal gg-J-lat cellijnen waarin een klein deel van het HIV-genoom aanwezig is, of het bijna volledige HIV-genoom met een frameshiftmutatie waardoor het envelopeiwit niet geproduceerd wordt.¹³ Deze cellijnen worden wereldwijd gebruikt voor onderzoek naar latente aanwezigheid van HIV. De COGEM was van oordeel dat de kans op vorming van RCL bij cellijnen met een minimaal HIV-genoom verwaarloosbaar klein is. Voor J-lat cellijnen met een bijna compleet HIV-genoom en een frameshiftmutatie in het *env*-gen was bekend was dat deze replicatiecompetente virusdeeltjes kunnen uitscheiden. De COGEM was van oordeel dat de kans op herstel van de frameshiftmutatie weliswaar klein was, maar niet geheel uitgesloten. De door de aanvrager voorgestelde RCL test (TZM-bl assay) achtte zij niet toereikend om RCL aan te tonen, maar stelde dat een eventueel ontstaan RCL alsnog geattenuerd is omdat het *nef*-gen ontbreekt en vervangen is door het GFP-gen. Mede omdat de werkzaamheden uitgevoerd werden in een separaat ML-II+ laboratorium waarbij maatregelen gehanteerd worden die vergelijkbaar zijn aan de condities waarop met HIV gekweekt wordt in een ML-III laboratorium, was zij van oordeel dat de voorgenomen experimenten op ML-II+ uitgevoerd konden worden. In een vervolgadvis¹⁴ heeft de COGEM verder gesteld dat een *nef*-gedeleteerd RCL onder bepaalde voorwaarden op ML-II gehanteerd kan worden:

- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- Open handelingen worden in een VK-II uitgevoerd;
- Gastheermateriaal is vrij van HIV-1 en -2, HTLV-1 en -2, SIV en andere lentivirussen;
- Het gebruik van 'sharps' wordt tot een minimum beperkt;
- De werkzaamheden worden in een separate ruimte (met toegangsdeur) 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;

- Al het biologische afval wordt verzameld en opgeslagen in breukvaste, lekdichte containers of een gelijkwaardige verpakking die in de werkruimte afgesloten worden alvorens deze afgevoerd worden.

Met betrekking tot de kloneringswerkzaamheden in *E. coli* heeft de COGEM in 2012 geadviseerd dat kloneringswerkzaamheden met het volledige genoom van virussen uit pathogeniteitsklasse 3 in bacteriën omlaaggeschaald kunnen worden naar ML-I.¹⁵ Dit omdat zij de kans verwaarloosbaar klein achtte dat er tijdens de kloneringswerkzaamheden in de bacterie correct geassembleerde infectieuze virusdeeltjes zullen ontstaan. Wanneer het om retrovirale genomen gaat, heeft de COGEM geadviseerd als aanvullende voorschriften op ML-I te hanteren:

- Het gebruik van handschoenen is verplicht;
- Tijdens de werkzaamheden mag geen gebruik worden gemaakt van scherpe en glazen voorwerpen of andersoortige voorwerpen die wondjes in de huid kunnen veroorzaken.

5. Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met geattenuëerd gg-HIV. De aanvrager is voornemens om DNA-plasmiden met een recombinant geattenuëerd HIV-1 proviraal genoom te construeren. Vervolgens worden cellen met deze DNA-plasmiden getransfecteerd voor productie van replicatiecompetent geattenuëerd HIV-1 om ten slotte cellen met de geproduceerde virusdeeltjes te infecteren. De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met het uitvoeren van de kloneringswerkzaamheden op ML-I en de productie- en infectiewerkzaamheden op ML-II met inachtneming van enkele aanvullende voorschriften.

5.1 Stabiliteit van de attenuatie van gg-HIV

Het gg-HIV zal dezelfde deleties en mutaties bevatten als de geattenuëerde HIV-1 variant R8.71, die door de aangebrachte deleties en mutaties verminderd in staat is te repliceren ten opzichte van wildtype HIV-1. Door een deletie van 637 nucleotiden zijn de accessoire genen *vif* en *vpr* uitgeschakeld. Het accessoire gen *vpu* is geïnactiveerd door een puntmutatie in het startcodon. In het *nef*-gen heeft een deletie van 100 nucleotiden plaatsgevonden en is een prematuur stopcodon geïntroduceerd door een puntmutatie. De COGEM is van oordeel dat deze gg-HIV geattenuëerd is ten opzichte van wildtype HIV-1. Zij merkt op dat de mogelijkheid bestaat dat de puntmutatie in het *vpu* gen hersteld kan worden, maar door de aangebrachte deleties in de andere accessoire genen *vif*, *vpr* en *nef*, zal het gg-HIV nog voldoende geattenuëerd blijven.^{7,8,9,10} De kans op genotypische reversie gedurende de werkzaamheden acht zij verwaarloosbaar klein door de aangebrachte deleties in meerdere accessoire genen.

5.2 Kloneringswerkzaamheden op ML-I

HIV replicateert van nature niet in prokaryote cellen zoals bacteriën, waarin de kloneringwerkzaamheden van de onderhavige vergunningaanvraag worden uitgevoerd. De verschillen tussen eukaryote cellen en bacteriën zijn groot. Op basis van de verschillen acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat HIV tijdens de kloneringswerkzaamheden in de bacterie kan repliceren en er infectieuze virusdeeltjes zullen ontstaan.^{15,16,17,18} Daarnaast acht de COGEM de kans klein dat het naakte plasmide tijdens de

kloneringswerkzaamheden door accidentele blootstelling een humane huidcel kan infecteren. Naakt DNA is niet goed in staat om een cel te infecteren. Door de attenuatie van het gg-HIV is de COGEM tevens van oordeel dat de kans dat dergelijke transfectie van de huid zal leiden tot de productie van infectieuze deeltjes en dat verdere verspreiding naar derden (d.w.z., het milieu) verwaarloosbaar klein is.

Bovenstaande in overweging nemende, kan de COGEM instemmen met het uitvoeren van de kloneringswerkzaamheden in bacteriën op ML-I.

5.3 Productie- en infectiewerkzaamheden op ML-II

Het plasmide DNA met het gg-HIV-1 genoom zal getransfekteerd worden in verschillende cellijnen. De hierbij geproduceerde gg-HIV deeltjes zijn replicatiecompetent, maar geattenuëerd door deleties in de accessoire genen. De replicatiecapaciteit van het gg-HIV neemt hierdoor af.^{7,8,9,10} Met inachtneming van de door bureau BGGO genoemde aanvullende voorschriften, kan de COGEM instemmen met de voorgestelde inschaling van de productie- en infectie werkzaamheden met geattenuëerd gg-HIV-1 op inperkingsniveau ML-II.

6. Conclusie

Alles in overweging nemende, stemt de COGEM in met de door de aanvrager voorgestelde inschaling van de beschreven kloneringswerkzaamheden met gg-HIV op ML-I. Ook stemt zij in met het uitvoeren van de productie- en infectiewerkzaamheden op ML-II, met inbegrip van de door BGGO genoemde aanvullende voorschriften (zie paragraaf 3.4). De COGEM is van oordeel dat bij het uitvoeren van de voorgenomen werkzaamheden op deze inperkingsniveaus en onder navolging van de aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

7. Signalerende opmerking

De COGEM merkt op dat gedurende de kloneringswerkzaamheden de kans op infectie van medewerkers met plasmiden zeer klein is, maar niet geheel uitgesloten kan worden. In het geval dat de medewerker blootgesteld wordt aan de plasmiden, zou dit kunnen leiden tot transductie van cellen in de medewerker. De COGEM signaleert derhalve om vanuit Arbo-overwegingen maatregelen te hanteren om de kans op besmetting van de medewerker te minimaliseren, zoals het gebruik van handschoenen en het vermijden van scherpe voorwerpen.

Referenties

1. Romani B & Cohen EA (2012). Lentivirus Vpr and Vpx accessory proteins usurp the cullin4-DDB1 (DCAF1) E3 ubiquitin ligase. *Curr. Opin. Virol.* 2: 755-763
2. Goff SP (2013). Retroviridae. In: *Fields virology*, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

3. 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
4. Strebel K (2013). HIV accessory proteins versus host restriction factors. *Curr. Opin. Virol.* 3: 692–699
5. Gramberg T *et al.* (2009). Accessories to the crime: recent advances in HIV accessory protein biology. *Curr HIV/AIDS Rep.* 6: 36-42
6. Escarpe P *et al.* (2003). Development of a sensitive assay for detection of replication-competent recombinant lentivirus in large-scale HIV-based vector preparations. *Mol. Ther.* 8: 333-341
7. Kawamura M *et al.* (1994). Growth ability of *Human immunodeficiency virus* type 1 auxiliary gene mutants in primary blood macrophage cultures. *J. Gen. Virol.* 75: 2427-2431
8. Gibbs JS *et al.* (1994). Construction and in vitro properties of HIV-1 mutants with deletions in "nonessential" genes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10: 343-350
9. Simon JHM *et al.* (1996). The *Human immunodeficiency virus* type 1 Vif protein modulates the postpenetration stability of viral nucleoprotein complexes. *J. Virol.* 70: 5297-5305
10. Jeeninga RE *et al.* (2005). Construction of a minimal HIV-1 variant that selectively replicates in leukemic derived t-cell lines: towards a new virotherapy approach. *Cancer Res.* 65: 3347-3355
11. COGEM (2023). Actualisatie van de pathogeniciteitsclassificatielijsten met humaan- en dierpathogene DNA- en RNA-virussen (2023). COGEM advies CGM/230929-01
13. COGEM (2021). Heroverweging inschaling werkzaamheden met replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes onder Ingeperkt Gebruik. COGEM advies CGM/210218-01
14. COGEM (2020). Advies omlaagschaling werkzaamheden met gg-cellijnen met HIV-constructen. COGEM advies CGM/200520-03
15. COGEM (2020). Vervolgadvies over omlaagschaling werkzaamheden met gg-cellijnen met HIV-constructen. COGEM advies CGM/200713-01
16. COGEM (2012). Inschaling van kloneringswerkzaamheden met genoom van pathogeniteitsklasse 3 virussen. COGEM advies CGM/120307-01
17. Ball LA (2001). Replication strategies of RNA viruses. In: *Fields Virology*. Edited by Knipe MD & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 105-118
18. DiMaio D & Coen DM (2001). Replication strategies of DNA viruses. In: *Fields Virology*. Edited by Knipe MD & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 119-132
19. Hunter E (2001). Virus assembly. In: *Fields Virology*. Edited by Knipe MD & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 171-197