

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
Mr. drs. A.W.H. Bertram
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 16 september 2026
KENMERK CGM/260916-02
ONDERWERP Advies Omlaagschaling werkzaamheden met cellen met HIV-constructen

Geachte mevrouw Bertram,

Naar aanleiding van een adviesvraag getiteld 'Downgrading cell lines with HIV Constructs', ingediend door het Erasmus Medisch Centrum (IG 20-167_005), deelt de COGEM u het volgende mee.

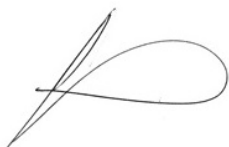
Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met cellen die met behulp van genetisch gemodificeerde (gg-)HIV-1 varianten aangepast worden. Hiervoor worden verschillende variaties van HIV-1 genomen afkomstig van verschillende subtypen van HIV-1 gebruikt. Sommige constructen missen meerdere HIV-genen, andere constructen bestaan uit een bijna volledig HIV-genoom, maar zonder het *nef*-gen en met een frameshiftmutatie waardoor het envelopeiwit niet geproduceerd wordt. Met verkregen gg-cellen zullen vervolgens experimenten uitgevoerd worden om onderzoek te doen naar verschillende HIV-1 subtypen. De onderzoekers verzoeken de experimenten op ML-II uit te voeren nadat de gg-HIV vectordeeltjes getest zijn op aanwezigheid van replicatiecompetent lentivirus (RCL). Enkele aanvullende maatregelen zullen worden gehanteerd.

Voor omlaagschaling moet onder meer de kans op het ontstaan van RCL in ogenschouw genomen worden. De COGEM kan bij de voorgenomen werkzaamheden niet volledig uitsluiten dat RCL gevormd wordt na transductie met de gg-HIV deeltjes. Voor cellijnen geproduceerd met constructen waarin meerdere HIV-genen ontbreken, zullen eventueel ontstane recombinanten verzwakt zijn en niet kunnen verspreiden. Zij stemt in met het uitvoeren van werkzaamheden met deze gg-cellen op ML-II, met de voorgestelde maatregelen. Voor gg-cellen geproduceerd met constructen bestaande uit een vrijwel volledig HIV-genoom adviseert zij echter de werkzaamheden op ML-III uit te voeren. Op deze inperkingsniveaus 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.

- Bureau ggo, Afdeling Gentechnologie en Biologische Veiligheid, RIVM
- Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal, Ministerie van IenW

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling zijn de COGEM-leden prof. dr. C.M.F. Dirven en dr. M. de Graaf niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Advies Omlaagschaling van werkzaamheden met cellen met verschillende HIV-1-constructen

COGEM-advies CGM/260916-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van transductiewerkzaamheden en experimenten met de verkregen getransduceerde cellen (IG 20-167_005). De aanvrager is voornemens Jurkat en SupT1 cellen te transduceren met genetisch gemodificeerde (gg)-HIV-1 (humaan immunodeficiëntievirus type-1; benaming volgens het International Committee on Taxonomy of Viruses: *Lentivirus humimdef1*) virussen om verschillende latent geïnfecteerde cellijnen te creëren voor onderzoek aan het nucleosomale landschap, transcriptie en translatie. De gg-HIV-constructen bestaan uit verschillende variaties van bijna volledige HIV-1 genomen en zijn replicatiedeficiënt. De aanvraag is afkomstig van het Erasmus Medisch Centrum.

De onderzoekers verzoeken het transduceren van de cellen en de experimenten met de getransduceerde cellijnen op ML-II uit te mogen voeren, mits de bij transductie gebruikte vectoren geen replicatiecompetent lentivirus (RCL) bevatten. De COGEM is gevraagd of de gebruikte RCL-test geschikt is om RCL in de batches gg-HIV aan te tonen, of de attenuatie van de gg-HIV-constructen stabiel is, en of zij kan instemmen met het voorgestelde verzoek tot omlaagschaling van ML-III naar ML-II.

2. Achtergrondinformatie HIV-1

HIV-1 is een enkelstrengs RNA-virus en behoort tot het genus van *Lentivirus* (subfamilie: *Orthoretrovirinae*).¹ Het virale RNA wordt na infectie van de cel gekopieerd naar een dubbelstrengs DNA. Dit DNA-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*), een packaging signaal (Ψ), een Rev-responsieve 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 zogenaamde '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-specifieke polymerase, het reverse transcriptase (RT), dat het virale RNA omzet naar dubbelstrengs DNA, het provirale genoom.^{2,3} Daarnaast codeert *pol* ook voor het enzym integrase, waardoor het provirale genoom in het DNA van de geïnfecteerde cel wordt geïntegreerd, en het protease enzym dat de *gag*- en *pol*-polyproteïnen klieft. De transcriptie-machinerie van de gastheercel zorgt voor de synthese van viraal RNA vanaf het geïntegreerde provirale DNA.

Het regulatoire gen *tat* 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 celkern naar het cytoplasma. Voor de binding van het capsid-eiwit met het virale RNA en de uiteindelijke vorming van virusdeeltjes is het packaging signaal Ψ in het RNA essentieel.

De accessoire genen zijn in vitro, d.w.z. in virus-celkweek in het laboratorium, niet essentieel voor virusreproductie, maar in vivo spelen ze een belangrijke rol in de virulentie.^{3,4,5} Zonder de accessoire genen kan HIV niet efficiënt repliceren in de mens.³

3. Voorgenomen werkzaamheden

Het doel van de voorgenomen werkzaamheden is om latent geïnfecteerde cellijnen te creëren die ieder met een ander subtype van HIV-1 (A-D) zijn geïnfecteerd. Dergelijke latent geïnfecteerde cellijnen zijn eerder gecreëerd (de J-Lat cellijnen), maar enkel voor HIV-1 subtype B.⁶ De gecreëerde cellijnen zullen als model dienen voor latent HIV-1 geïnfecteerde CD4⁺ T cellen en zullen gebruikt worden om het nucleosomale landschap, transcriptie en translatie te bestuderen.

3.1 Beschrijving van de gg-HIV-constructen

In totaal worden 7 verschillende HIV-constructen gebruikt. Drie van de constructen (pQ23-17-E+eGFP, pMJ4-E+eGFP en p94UG114.1-E+eGFP) bestaan uit een bijna volledig HIV-genoom (gebaseerd op consensus-sequenties van HIV-1 subtype A1, C en D isolaten), waaruit het *nef*-gen deels is verwijderd en vervangen door eGFP, en een frameshiftmutatie in het *env*-gen aanwezig is. De frameshiftmutatie betreft een insertie van twee basenparen (TA) in de *env*-sequentie, waardoor rond aminozuren 80-85 een vroegtijdig stopcodon wordt geïntroduceerd.

In de andere vier constructen (pA1A2, pBA2, pCA2 en pDA2) zijn de complete LTRs, een deel van het *gag*-gen, een deel van het *env*-gen (dat overlapt met het RRE), en het *tat*-gen aanwezig. pA1A2, pCA2 en pDA2 zijn volgens de aanvrager gebaseerd op consensus-sequenties van meerdere subtype-isolaten. pBA2 (subtype B) is gebaseerd op vector pNL4.3, omdat dit de meest gangbare vector is die gebruikt wordt om subtype B te representeren in HIV-onderzoek. De plasmiden zijn gegenereerd door GeneUniversal en gesequenced door Plasmidsaurus.

De gg-virussen worden geproduceerd door transfectie van HEK293T-cellen met de hierboven genoemde plasmiden, een VSV-G plasmide en een packaging plasmide (psPAX2). Een pEV731 plasmide is gebruikt als negatieve controle. De verkregen gg-HIV-vectordeeltjes worden getest op afwezigheid van RCL middels een protocol gebaseerd op Cornetta et al. (2010),⁷ waarbij SupT1-cellen worden geïnfecteerd en gebruik gemaakt wordt van een CA-p24 ELISA voor de detectie van RCL. De aanvrager geeft aan dat zij een RCL-test zal uitvoeren bij iedere nieuw geproduceerde virusbatch en dat deze negatief dient te zijn voordat omlaagschaling plaats zal vinden.

3.2 Vervaardiging van en experimenten met de latent geïnfecteerde cellijnen

De nieuw vervaardigde gg-HIV-vectordeeltjes worden gebruikt om Jurkat en SupT1 cellen te transduceren, waarmee nieuwe latent geïnfecteerde cellijnen verkregen worden. De nieuw verworven gg-cellijnen zullen behandeld worden met transcriptie- en translatie-modulerende stoffen ('latency reversal agents' en 'latency promoting agents') om subtype-specifieke verschillen in respons te bestuderen. Ook zullen de gg-cellen behandeld worden met bestaande en nieuwe therapieën om de subtype-specifieke verschillen in respons te bestuderen. Daarnaast zullen de gg-cellijnen gebruikt worden voor analyse van het nucleosomale landschap en om bestaande en nieuwe diagnostische assays en onderzoeksmethoden te valideren voor verschillende HIV-1 subtypen.

De verworven cellijnen zullen met regelmaat een (deel van de) RCL-test ondergaan om te controleren dat er geen replicerend virus wordt gemaakt.

3.3 Voorgesteld inperkingsniveau en aanvullende voorschriften

De aanvrager verzoekt een omlaagschaling naar ML-II voor het transduceren van de Jurkat en SupT1 cellijnen met de gg-HIV-vectordeeltjes en de daaropvolgende werkzaamheden met de gecreëerde gg-cellijnen, met inachtneming 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 is niet toegestaan om gelijktijdig werkzaamheden uit te voeren met wildtype of mutante lentivirussen, dan wel met vector- of donorsequenties die HIV-*env* of -*nef* gendefecten kunnen herstellen of complementeren;
- 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).

De productie van de gg-HIV-vectordeeltjes en het uitvoeren van de RCL-testen zal op ML-III plaatsvinden. Om te bevestigen dat de Jurkat en SupT1 cellijnen geen lentivirussen (en geen *env*-genen) bevatten, wordt een qPCR uitgevoerd op de cellijnen met primers voor verschillende HIV-1-genen en de LTR van HIV-1. Omdat HIV-2, HTLV-1 en -2, en SIV nooit in het laboratorium van de aanvrager gebruikt zijn en de kans dat de cellen daarmee geïnfecteerd zijn klein is, zal de aanvrager hier niet op testen.

4. Eerder COGEM-advies

HIV is een virus uit pathogeniteitsklasse 3.⁸ In 2021 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over de inschaling van werkzaamheden (productie, transductie, en werkzaamheden met getransduceerde cellen) met lentivirale en gammaretrovirale vectoren.⁹ Voor productie- of transductiewerkzaamheden met lentivirale vectoren en werkzaamheden met lentiviraal getransduceerde cellen heeft de COGEM een inschaling op inperkingsniveau ML-I geadviseerd indien aan de volgende voorwaarden voldaan wordt:

- De te gebruiken cellen zijn bij alle handelingen vrij van lentivirussen, teneinde het ontstaan van een recombinant virus, of mobilisatie van het vectorgenoom uit te sluiten;
- Bevestigd is dat er tijdens de productie geen RCL kan ontstaan, of in het geval van transductie-werkzaamheden (of daaropvolgend werkzaamheden met lentiviraal getransduceerde cellen) de toe te passen of toegepaste vectorbatches vrij zijn van RCL.

Indien niet aan deze voorwaarden wordt voldaan, geldt een inschaling op ML-III.

Ook heeft de COGEM eerder geadviseerd over de mogelijkheid tot omlaagschaling van werkzaamheden met lentiviraal getransduceerde cellijnen. Het betrof hier J-Lat cellijnen met een minimaal HIV-1 genoom (J-lat cellijnen A72, A2, H2, D en E) verkregen door transductie met niet-SIN lentivirale vectoren verkregen met een 2^e generatie lentiviraal vectorsysteem, en J-Lat cellijnen met een bijna volledig HIV-1 genoom (J-lat cellijnen 11.1, 6.3, 15.4, 8.4 en 9.2) waarbij het *nef*-gen is vervangen door een GFP open reading frame (ORF) en een frameshiftmutatie aanwezig is in het *env*-gen. Voor de cellen met een minimaal HIV-genoom oordeelde de COGEM dat een RCL-test niet noodzakelijk was, omdat deze cellijnen wereldwijd veel gebruikt zijn in laboratoria en aanwezigheid van infectieuze lentivirusdeeltjes nooit is gemeld. Voor de andere cellijnen was de COGEM van oordeel dat reversie

van de frameshiftmutatie niet geheel uitgesloten kan worden, en een uitgevoerde 'TZM-bl reporter cell line assay' onvoldoende uitsluitsel gaf over de afwezigheid van RCL. Omdat de werkzaamheden plaats zouden vinden in een speciaal toegewezen ML-II+ laboratorium waar verschillende aanvullende voorschriften worden gehanteerd die specifiek toegesneden zijn om overdracht van HIV te voorkomen (met als voornaamste maatregel dat er niet met scherpe voorwerpen gewerkt mag worden), kon zij toch instemmen met een inschaling op ML-II+. ¹⁰

In een vervolgadvis¹¹ over deze werkzaamheden met latent geïnfecteerde J-Lat cellijnen heeft de COGEM naar aanleiding van vragen vanuit Bureau GGO verdere uitleg gegeven over haar inschalingsadvies. Hierin is onder andere gesteld dat een *nef*-gedeleteerd RCL ontstaan na reversie in de J-Lat cellijnen 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 donorsequenties 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.

5. Overweging en advies

In de onderhavige aanvraag wordt verzocht om op ML-II latent geïnfecteerde cellijnen te creëren door transductie met replicatiedeficiënte gg-HIV-vectordeeltjes, en experimenten met de verworven cellijnen uit te voeren. Volgens de aanvrager zullen de nieuw te vervaardigen cellijnen met een vrijwel volledig HIV-genoom identiek zijn aan de J-Lat cellijnen 11.1, 6.3, 15.4, 8.4 en 9.2, waarover de COGEM eerder heeft geadviseerd. ^{10,11}

Potentiële risico's die bij de overweging een rol spelen betreffen de mogelijke aanwezigheid van RCL en de stabiliteit van het replicatiedeficiënte karakter van de HIV-constructen. De COGEM is gevraagd of de door de aanvrager gehanteerde RCL-test als geaccepteerde, gevalideerde en als gevoelig aangemerkte methode kan worden beschouwd om RCL in de batches gg-HIV-vectordeeltjes aan te tonen; of de moleculaire basis van de replicatiedeficiëntie van de HIV-constructen voldoende is gekarakteriseerd en als stabiel kan worden beschouwd, en of zij kan instemmen met de voorgestelde inschaling voor de voorgenomen werkzaamheden.

5.1 De RCL-test

De aanvrager levert in de vergunningaanvraag informatie aan over de RCL-test. De batches met gg-HIV-vectordeeltjes worden op ML-III getest op aanwezigheid van RCL door middel van een CA-p24 ELISA. De uitvoerder beschrijft dat de test uitgevoerd wordt op SupT1-cellen. De COGEM wijst erop dat het protocol, waarop de test gebaseerd is, het gebruik van C8166 cellen beschrijft,⁷ waarop HIV – en met name geattenueerde varianten – veel beter repliceert. Mogelijk is een RCL-test op SupT1-cellen minder gevoelig.¹² Het is bovendien niet duidelijk of de HIV-isolaten waarop de constructen met een

vrijwel volledig HIV-genoom (pQ23-17-E+eGFP, pMJ4-E+eGFP en p94UG114.1-E+eGFP) zijn gebaseerd, goed repliceren en een duidelijk cytopathogeen effect induceren op SupT1-cellen.

De COGEM concludeert dat de uitgevoerde RCL-test niet genoeg uitsluitsel geeft over de aanwezigheid van RCL tijdens productie. De COGEM merkt eveneens op dat wanneer de batches met de gg-virussen negatief testen op RCL, dit niet uitsluit dat er alsnog RCL kan ontstaan na of tijdens de transductie van de cellen met de verschillende gg-HIV-constructen. In de volgende paragraaf wordt hier verder op ingegaan.

5.2 Stabiliteit van de replicatiedeficiënte eigenschap van de HIV-constructen

In de constructen met een vrijwel volledig HIV-genoom (pQ23-17-E+eGFP, pMJ4-E+eGFP en p94UG114.1-E+eGFP) wordt door de frameshift-mutatie de productie van het Env-eiwit geblokkeerd. Dezelfde frameshiftmutatie is aanwezig in bestaande J-Lat-cellijnen (11.1, 6.3, 15.4, 8.4 en 9.2) die jarenlang in het laboratorium van de aanvrager gebruikt zijn, en geen reversie laat zien. De aanvrager is daarom van mening dat de kans op reversie in het *env*-gen van de nieuwe vectorgenomen verwaarloosbaar klein is.

De COGEM is van oordeel dat het niet uitgesloten is dat bij de pQ23-17-E+eGFP, pMJ4-E+eGFP en p94UG114.1-E+eGFP constructen die een bijna volledig HIV-genoom bevatten, herstel van de frameshiftmutatie optreedt. De COGEM merkt op dat tijdens het reverse transcriptieproces bij de transductie van de Jurkat en SupT1 cellen het Env-ORF door spontane mutaties (bijvoorbeeld een kleine insertie of deletie van nucleotiden) kan worden hersteld. Daarmee bestaat er een significante kans dat een Nef-deficiënt HIV ontstaat, dat in vitro naar verwachting goed zal repliceren. 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. De COGEM merkt echter ook op dat niet geheel uitgesloten kan worden dat tijdens de replicatie mutaties optreden, waardoor een deel van de attenuatie van een *nef*-gedeleteerd HIV verloren kan gaan.^{13, 14, 15} Zo zijn er gevallen bekend waarin een Nef-deficiënt HIV in vivo leidt tot ziekte.^{16, 17, 18, 19} De COGEM acht het risico op het ontstaan van een dergelijk RCL bij transductie mogelijk groter dan tijdens de productie van de gg-HIV-deeltjes in de 293T cellen.

Voor de vier constructen waarin een groot deel van het HIV-genoom afwezig is (pA1A2, pBA2, pCA2 en pDA2), kan de COGEM niet uitsluiten dat bij de transductie recombinatie plaatsvindt door co-packaging en reverse transcriptie van het HIV vector-RNA (geproduceerd door pA1A2, pBA2, pCA2 en pDA2) en het *gag-pol-tat-rev*-mRNA (geproduceerd door de psPAX2 packaging vector). Hierbij zou een recombinant kunnen ontstaan met een volledige LTR afkomstig van de HIV-vector, en de *gag-pol-tat-rev* genen uit het packaging construct, een fenomeen dat eerder in de wetenschappelijke literatuur is beschreven.^{20, 21} Het is niet geheel uit te sluiten dat bij vervolgwerkzaamheden met de getransduceerde cellen in de aanwezigheid van een glycoproteïne, zoals VSV-G, infectieuze HIV-deeltjes worden geproduceerd. Echter, zolang geen glycoproteïne-gen in het genoom is opgenomen, kunnen deze deeltjes zich niet verder verspreiden. Door het ontbreken van diverse HIV-genen zullen dergelijke infectieuze deeltjes bovendien geattenuëerd zijn.

5.3 Vergelijking met eerder beschreven J-Lat cellen

Eerder heeft de COGEM werkzaamheden met J-Lat cellen met een vrijwel volledig HIV-genoom (J-Lat cellen 11.1, 6.3, 15.4, 8.4 en 9.2) waarbij een *nef*-gedeleteerd RCL kan ontstaan, toegestaan op een speciaal uitgerust ML-II+ laboratorium.^{10,11} Omdat de subtypen van de verschillende HIV-varianten bij de voorgenomen werkzaamheden anders zijn dan het subtype dat gebruikt is voor het vervaardigen van de J-Lat 11.1, 6.3, 15.4, 8.4 en 9.2 cellen, zou dit de kans op het ontstaan van een replicerende variant kunnen beïnvloeden. Bovendien betreffen de J-Lat cellen klonale cellijnen, die geselecteerd zijn op een latent fenotype en ook na langdurig kweken in verscheidene laboratoria geen RCL laten zien. In de HIV-genomen in deze cellen zouden ook andere mutaties aanwezig kunnen zijn die replicatie en daarmee de vorming van een RCL, belemmeren.

Anders dan deze J-Lat cellen, betreffen de door de aanvrager te produceren cellen populaties van geïnfecteerde cellen die niet geselecteerd zijn op een latent fenotype. Deze nieuw verworven cellijnen zijn bovendien niet wereldwijd langdurig in gebruik, zoals de J-Lat cellen, en er is nog niet aangetoond dat tijdens dergelijk gebruik geen reversie optreedt.

Bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de kans op het ontstaan van een replicerende HIV-variant groter is bij de voorgenomen werkzaamheden, dan bij de J-Lat cellen.

6. Conclusie en advies

Op basis van de aangeleverde informatie is de COGEM van oordeel dat de gebruikte RCL-assay niet genoeg uitsluitsel geeft over de aanwezigheid van RCL, gezien er ook een significante kans bestaat op het ontstaan van RCL na de transductie van de Jurkat- en SupT1-cellen.

Voor cellijnen die getransduceerd zijn met de vier constructen waarin een groot deel van het HIV-genoom afwezig is (pA1A2, pBA2, pCA2 en pDA2) zullen eventueel ontstane recombinanten geattenuëerd zijn door het ontbreken van diverse HIV-genen, en in afwezigheid van VSV-G niet kunnen verspreiden. De COGEM kan derhalve instemmen met het uitvoeren werkzaamheden met deze constructen en cellijnen op ML-II inperkingsniveau, met inachtneming van de door de aanvrager voorgestelde 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^a;
- Het is niet toegestaan om gelijktijdig werkzaamheden uit te voeren met wildtype of mutante lentivirussen, dan wel met vector- of donorsequenties die HIV-*env* of -*nef* gendefecten kunnen herstellen of complementeren;
- 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).

Voor de cellijnen die getransduceerd zijn met de drie constructen met een vrijwel volledig HIV-genoom (pQ23-17-E+eGFP, pMJ4-E+eGFP en p94UG114.1-E+eGFP), kan de COGEM niet instemmen met

a. In de aanvraag is aangegeven dat niet getest wordt op aanwezigheid van HIV-2, HTLV-1 en -2. Indien de aanvrager ervan verzekerd is dat de cellen afkomstig zijn van een lab waar deze virussen niet gehanteerd worden, is de COGEM van oordeel dat het testen op HIV-2, HTLV-1 en 2, en SIV achterwege gelaten kan worden.

omlaagschaling. De COGEM wijst erop bij transductie een groter risico is op reversie van de frameshiftmutatie. De door de aanvrager te produceren cellen betreffen populaties van geïnfecteerde cellen die niet geselecteerd zijn op een latent fenotype en die, anders dan de eerder beschreven J-Lat-cellijnen, niet langdurig in gebruik zijn zonder dat reversie is aangetoond. Reversie kan leiden tot een Nef-deficiënte HIV-variant die goed replicateert in vitro en in vivo tot ziekte kan leiden. De COGEM adviseert de voorgenomen werkzaamheden met deze constructen in te schalen op ML-III.

De COGEM is van oordeel dat bij de uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op de geadviseerde inperkingsniveaus, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) taxonomy. Taxonomy of Lentivirus humimdefi. https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202305030 (bezocht op 2 september 2026)
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. Jordan A et al. (2003). HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. EMBO J. 22: 868-1877
7. Cornetta K et al. (2010). Replication-competent lentivirus analysis of clinical grade vector products. Mol. Ther. 19: 557-566
8. COGEM (2026). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van DNA- en RNA-virussen (2026). COGEM-advies CGM/260225-03
9. Heroverweging inschaling werkzaamheden met replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes onder Ingeperkt Gebruik. COGEM-advies CGM/210218-01
10. COGEM (2020). Omlaagschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerde cellijnen met HIV-1 constructen. COGEM-advies CGM/200520-03
11. COGEM (2020). Vervolgadvies over omlaagschaling werkzaamheden met gg-cellijnen met HIV-constructen. COGEM-advies CGM/200713-01
12. Escaarpe 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: 332-341
13. Berhout B et al. (1999). Genetic instability of live, attenuated human immunodeficiency virus type 1 vaccine strains. J. Virol. 73: 1138-1145
14. Learmont JC et al (1999). Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. N. Engl. J. Med. 340: 1715-1722
15. Jekle A et al (2002). Coreceptor phenotype of natural human immunodeficiency virus with nef deleted evolves in vivo, leading to increased virulence. J. Virol. 76: 6966-6973
16. Jekle A et al. (2002). Coreceptor phenotype of natural human immunodeficiency virus with nef deleted evolves in vivo, leading to increased virulence. J. Virol. 76: 6966-6973
17. Learmont JC et al. (1999). Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1 — A report from the Sydney blood bank cohort. N. Engl. J. Med. 340: 1715-1722
18. Zaunders J et al. (2011). The Sydney Blood Bank Cohort: implications for viral fitness as a cause of elite control. Curr. Opin. HIV AIDS. 6: 151-156
19. Churchill MJ et al. (2006). Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1 *nef*/long terminal repeat sequences in a cohort of long-term survivors infected from a single source. J. Virol. 80: 1047-1052
20. Kuate S et al (2014). Analysis of partial recombinants in lentiviral vector preparations. Hum. Gene Ther. Methods 25: 126-135
21. Wu X et al (2000). Development of a novel trans-lentiviral vector that affords predictable safety. Mol. Ther. 2: 47-55