

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Dhr. J.J. Atsma
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 28 november 2011
KENMERK CGM/111128-02
ONDERWERP Adviesvraag productie baculovirussen in SUB, IG 11-035.c01

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de ontwerpbeschikking DGM/RB IG 11-035 en de vergunningaanvraag, getiteld 'Gebruik van single use bioreactoren' van Intervet International BV, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over een ontwerpbeschikking voor de grootschalige productie van de vaccincomponenten, E2 eiwit van het *Classical swine fever virus* en het mantelwit van het *Porcine circovirus*. Deze eiwitten worden geproduceerd met behulp van genetisch gemodificeerde (gg-) baculovirussen en insectencellen in een zogenaamde 'Single-Use Bioreactor' (SUB).

Risico's die in overweging genomen moeten worden, kunnen ontstaan wanneer gg-baculovirussen bij een calamiteit vrijkomen uit het gesloten productiesysteem, met een eventuele verspreiding in het milieu tot gevolg. De COGEM is van mening dat de door de aanvrager voorgestelde maatregelen en werkprocedures adequaat zijn om te voorkomen dat gg-baculovirus terechtkomt in het milieu. Conform de inrichting- en werkvoorschriften voor een MI-III procesinstallatie is een opvangbak voor eventuele lekkages aanwezig. Besmet materiaal zoals de gebruikte SUB zullen via gevalideerde methoden worden gedesinfecteerd.

Indien in het uitzonderlijke geval toch baculovirus vrijkomt uit het productiesysteem, is de kans verwaarloosbaar klein dat het gg-virus zich verder verspreidt. Het gastheerbereik van het baculovirus is beperkt tot enkele vlindersoorten en de recombinante virussen zijn sterk verminderd infectieus ten opzichte van het wildtype virus.

Omdat het gehanteerde baculovirussysteem niet erkend is als een groep 1 organisme, dienen de werkzaamheden, de Regeling ggo volgend, uitgevoerd te worden onder inperkingsniveau MI-III. De COGEM acht de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen handelingen onder deze inperking verwaarloosbaar klein.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c.

Drs. H.P. de Wijs

Dr. I. van der Leij

Productie van CSFV E2 en PCV mantelwit met behulp van een baculovirusexpressiesysteem in een Single-Use Bioreactor

COGEM advies CGM/111128-02

1. Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag door Intervet International B.V. voor de grootschalige productie van virale eiwitten met behulp van een zogenaamd baculovirusexpressiesysteem in een Single-Use Bioreactor (SUB). De aanvrager is voornemens om het E2 eiwit van het *Classical swine fever virus* (CSFV) of het mantelwit van het *Porcine circovirus* (PCV) tot expressie te brengen in insectencellen met behulp van baculovirus-expressievectoren. Aangevraagd is om de productie te mogen laten plaatsvinden in een SUB van 500 liter van het type Hyclone HyC^R CX5-14 (van Thermo Scientific) op MI-III niveau.

1.1 Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft in de afgelopen jaren verschillende keren geadviseerd over het gebruik van SUB's.^{1,2,3} In alle gevallen achtte de COGEM onder de bij de aanvraag gespecificeerde voorwaarden en mede gezien de aard van de te kweken ggo's de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein. Wel heeft de COGEM opmerkingen gemaakt over de integriteitstesten van de SUB's die voorafgaand aan de productie moeten plaatsvinden.

In 2010 heeft de COGEM geadviseerd over een vergunningaanvraag waarin dezelfde SUB is gebruikt als in de onderhavige vergunningaanvraag (CGM/101028-03).⁴ De aanvraag betrof een wijziging van een bestaande vergunning waarin grootschalige productie (tot 1000 l) in dierlijke gg-cellen was vergund met behulp van conventionele stalen reactievaten. De COGEM adviseerde positief maar adviseerde dat de integriteitstest voorafgaande aan de productie onder de maximaal toelaatbare druk en met het kweekvolume te laten plaatsvinden.

In 2006 heeft de COGEM geadviseerd over een vergunningaanvraag waarin hetzelfde baculovirusexpressiesysteem werd gebruikt als in deze vergunningaanvraag.⁵ In die vergunning werd grootschalige productie van de vaccincomponent, influenzavirus hemagglutinine aangevraagd. De COGEM was destijds van mening dat de door de aanvrager voorgestelde maatregelen afdoende waren om te voorkomen dat het gg-baculovirus in het milieu terecht zou komen. Verder wees de COGEM erop dat indien het gg-virus toch vrij zou komen uit het productieproces, de kans verwaarloosbaar klein was dat het virus zich verder zou kunnen verspreiden. De COGEM was van mening dat de risico's voor mens en milieu bij de handelingen conform de vergunningaanvraag verwaarloosbaar klein waren. Omdat het gehanteerde baculovirussysteem niet erkend is als een groep 1 organisme, moesten de werkzaamheden volgens de Regeling ggo uitgevoerd worden onder inperkingsniveau MI-III. De COGEM merkte echter op dat, hoewel wettelijk gezien niet mogelijk, inschaling op het lagere MI-II niveau in dat specifieke geval ook voldoende was om de risico's verwaarloosbaar klein te maken.

1.2 Inrichtingsvoorschriften procesinstallaties

Grootschalige kweek van ggo's is gebonden aan regels die worden voorgeschreven in bijlage 4 van de Regeling ggo.⁶ Op MI-I inperkingsniveau worden uitsluitend organismen gehanteerd die voldoen aan de zogenoemde IAB criteria. Op MI-II inperking of hoger worden organismen gehanteerd die geen IAB erkenning hebben. In deze ruimten moet het fysisch inperkende systeem zo geconstrueerd zijn dat de verspreiding van de ggo's wordt beperkt. Tevens moeten de ggo's na afloop van de werkzaamheden volgens een gevalideerde methode zijn geïnactiveerd alvorens de inhoud van het fysisch inperkende systeem geloosd mag worden.

Omdat baculovirussen als klasse 2 pathogeen zijn ingedeeld en de ggo's in deze vergunningaanvraag geen IA of IAB erkenning hebben, moeten de werkzaamheden op inperkingsniveau MI-III plaatsvinden.⁶ Dit betekent onder meer dat in de procesinstallatie de leidingen voorzien moeten zijn van hydrofobe absoluutfilters en dat er een voorziening aanwezig moet zijn voor de opvang van de totale inhoud van het gesloten systeem (het reactorvat of de SUB).

2. Overwegingen

De aanvrager is voornemens om het CSFV E2 eiwit en het PCV manteleiwit grootschalig te produceren met behulp van een baculovirusexpressiesysteem in een Single-Use Bioreactor (SUB) op MI-III niveau.

In de afgelopen twintig jaar is het baculovirus-insectencel expressiesysteem uitgegroeid tot een van de meest wijd gebruikte systemen voor de expressie en productie van eiwitten.^{7,8} De meeste vectoren zijn gebaseerd op het *Autographa californica multiple nucleopolyhedrosisvirus* (AcMNPV). Het baculovirusexpressiesysteem biedt een aantal voordelen boven andere systemen zoals een hoge expressie, makkelijk te kweken (insecten)cellen en in het geval van eukaryote eiwitten een juiste post-translationele modificatie, zoals glycosylering.

SUB's worden in de afgelopen jaren steeds vaker toegepast. SUB's zijn in het gebruik vaak goedkoper dan conventionele systemen omdat bespaard kan worden op sterilisatie en schoonmaak van de reactievaten. Bovendien ligt de productie niet stil vanwege de schoonmaak, omdat meteen een nieuwe SUB ingezet kan worden.

2.1 Single-use Bioreactor

De productie zal plaatsvinden in een SUB van 500 liter van het type Hyclone HyC^R CX5-14 (leverancier: Thermo Scientific). Het betreft een systeem met ingebouwde magneetroerder, waarbij de zak wordt geplaatst in een stalen omhulsel.⁹ De COGEM heeft in 2010 de veiligheid van deze bioreactor als voldoende beoordeeld voor werkzaamheden op ML-III niveau.

In theorie bestaat er bij gebruik van een kweekstelsel bestaande uit kunststof zakken een verhoogde kans op lekkage (vergeleken met een conventioneel stalen systeem) waarbij het ggo kan vrijkomen. Deze lekkage kan bijvoorbeeld optreden als gevolg van scheurtjes in de zak. Zoals voorgeschreven voor MI-III is een lek- of opvangbak aanwezig zodat eventuele lekkages niet tot

verspreiding kan leiden van het ggo in of uit de MI-III ruimte. Verder wordt voorafgaand aan de productie in de SUB een integriteitstest uitgevoerd.

Bij het toevoegen van het ggo aan het kweekmedium en het nemen van monsters worden geen open handelingen verricht. Na de productie wordt de inhoud van de SUB overgepompt naar een conventioneel fysisch ingeperkt systeem in de MI-III ruimte waar verdere opwerking of processing zal plaatsvinden. Alle materialen die levende ggo's bevatten worden gesteriliseerd via hitte of chemische desinfectie. De gebruikte lege SUB wordt door middel van autoclavering bij 120 °C gedesinfecteerd. Bekend is dat baculovirussen worden geïnactiveerd door verhitting tot 60 °C gedurende één uur.¹⁰ De aanvrager heeft validatieprotocollen overlegd over de hitte- en andere desinfectiestappen. De COGEM is van mening dat uit de door de aanvrager overlegde gegevens blijkt dat restmateriaal effectief geïnactiveerd wordt.

2.2. Eigenschappen van het ggo

Vectoren

Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) behoort tot de familie van de *Baculoviridae*, en het genus *Nucleopolyhedrovirus*.¹¹ Baculovirussen kunnen ziekten veroorzaken bij een groot aantal verschillende soorten insecten. In het algemeen is het gastheerbereik van de verschillende virussen beperkt tot enkele insectensoorten binnen een genus of een familie. AcMNPV is oorspronkelijk geïsoleerd uit de rupsen van de nachtvlinder *Autographa californica*, de 'Alfalfa looper'. Larven van verschillende *Lepidoptera* soorten (orde van motten en vlinders) zijn gevoelig voor AcMNPV.¹² AcMNPV en andere nucleopolyhedrovirussen worden ingezet als biologische bestrijdingsmiddelen in de land- en tuinbouw.

Het genoom van nucleopolyhedrovirussen bestaat uit circulair dubbelstrengs DNA.¹² VirusrePLICatie en expressie van het genoom vindt plaats in twee fasen, de zogenaamde vroege en late fase. De virale genen die tot expressie komen in de late fase worden onderverdeeld in late en zeer late genen. De zeer late genen zijn het *polyhedrine* gen en het *p10* gen. Deze genen staan onder invloed van zeer sterke promotoren en komen tot zeer hoge expressie.¹³ Achtenveertig uur na infectie bestaat 50% van het eiwit in virus-geïnfecteerde cellen uit polyhedrine en p10.¹⁴ De functie van het p10-eiwit is grotendeels onbegrepen. Het eiwit vormt fibrillaire structuren in de geïnfecteerde cel en interacteert met het cytoskelet en de microtubuli in de cel. P10 wordt verondersteld een rol te spelen bij de vorming van de polyeders en de virusdeeltjes en de lysis van de geïnfecteerde cel.¹⁵

Het *polyhedrine* gen is essentieel voor de vorming van de kenmerkende polyeders die essentieel zijn voor de infectiecyclus. Bij de nucleopolyhedrovirussen worden meerdere nucleocapsiden door één envelop omhuld. Meerdere van deze multiple nucleocapsiden worden ingekapseld in een polyeder. Polyeders zijn grote eiwitstructuren van polyhedrine-eiwit die duidelijk zichtbaar zijn met een lichtmicroscop. De polyeders worden omgeven door een eiwitmembraan. De polyeders worden gevormd in de kern van een gastheercel en komen vrij door kerndesintegratie.¹²

Horizontale overdracht van baculovirussen vindt hoofdzakelijk oraal plaats.^{11,16} In de natuur komen na verslijming van de geïnfecteerde rupsen de polyeders vrij. Vraat van bladeren of plantmateriaal waarop de polyeders aanwezig zijn, leidt tot infectie. De polyeders beschermen de virusdeeltjes tegen nadelige milieu-invloeden zoals UV-licht, temperatuur- en weersinvloeden.

Bij het gebruik van baculovirussen als expressievector, kan het gewenste gen op de plaats van het *polyhedrine* gen of het *p10* gen ingebouwd worden. Beide genen zijn onder laboratoriumcondities niet essentieel voor de infectie van de gastheercel en replicatie van het virus.^{12,15} Doordat het tot expressie te brengen gen onder controle staat van de sterke *p10* of *polyhedrine* promotor wordt het recombinante eiwit tijdens de virale expressie in insectencellen in hoge mate geproduceerd.¹³

Deletie van het polyhedrine gen leidt tot sterke mate van biologische inperking van het virus omdat het virus niet in staat is om polyeders te vormen. Wanneer de nucleocapsiden vrijkomen uit de cel zijn ze niet meer omgeven door een polyeder en daardoor gevoelig voor milieuomstandigheden, zoals uitdroging en UV licht. Daarnaast is het DNA niet meer beschermd tegen inactivatie of afbraak door het darmstelsel van het gastheerinsect. De afwezigheid van polyeders beperkt de overlevingsduur van het virale DNA in het milieu van een aantal maanden tot enkele uren/dagen. Een dergelijk virus is sterk verminderd infectieus ten opzicht van het wildtype virus.^{17,18,19,20}

Het p10 gen is niet essentieel voor infectie en replicatie. P10 deletiemutanten zijn in staat polyeders te vormen, maar de specifieke eiwitmembraan rond de polyeders lijkt niet of minder aanwezig, waardoor de polyeders minder stabiel worden geacht.^{21,22}

In de door de aanvrager voorgestelde werkzaamheden wordt gebruikt gemaakt van baculovirusexpressievectoren waarin het *polyhedrine* gen (pVL1392²³) of *p10* gen (pAcAs3²⁴) vervangen zijn door het PCV manteleiwitgen of het CSVV E2 gen.

Donorsequenties

Classical swine fever virus (CSFV) behoort tot de familie van de *Flaviviridae*, genus *Pestivirus*. CSFV is een zeer besmettelijk en ernstig dierpathogeen van Europese tamme en wilde varkens, dat door de COGEM is geclassificeerd als een klasse 4 dierpathogeen.²⁵

Het genoom van de pestivirussen bestaat uit een enkelstrengs positieve RNA-streng van circa 12,3 kb omgeven door nucleocapside en een envelop.¹¹ Het RNA codeert voor één enkel polyproteïne. Door proteolytische klievingen worden vier structurele eiwitten (C, E^{ms}, E1 en E2) en zeven tot acht niet-structurele eiwitten gevormd. Het nucleocapside (C) omhult het RNA. De overige structurele eiwitten zijn glycoproteïnen en vormen samen met het gastheermembraan de envelop. E2 is sterk immunogeen en kan na gebruik als vaccin bescherming bieden tegen infectie.

Porcine circovirus (PCV) behoort tot de familie van de *Circoviridae*, genus *Circovirus*. Het virus vormt bolvormige virusdeeltjes van 19,1 - 26,5 nm in grootte. Het virusdeeltje is opgebouwd uit één manteleiwit dat een cirkelvormig ambisense enkelstrengs DNA molecuul (ca. 1,7 kb) omvat.

Twee virusspecies worden onderscheiden: PCV-1 en PCV-2 die beiden varkens infecteren. PCV-2 wordt geassocieerd met wegwijnziekte ('Post multisystemic wasting syndrome', PMWS), dat leidt tot grote uitval bij biggen. De COGEM heeft PCV niet geassocieerd in een pathogeniteitsklasse.

Gezien de aard en functie van CSFV E2 en PCV manteleiwit is er geen reden om aan te nemen dat expressie van deze eiwitten leidt tot een verhoogde pathogeniteit van het baculovirus. Beide eiwitten hebben geen structurele of functionele homologie met polyhedrine of p10-eiwit. Inbouw van de eiwitten in de envelop van het baculovirus is zeer onwaarschijnlijk omdat het PCV manteleiwit geen membraangebonden eiwit is, en E2 in CSFV als polyproteïne wordt gesynthetiseerd en na de insertie in het membraan wordt afgesplitst. Bekend is dat E2 niet in de envelop ingebouwd wordt van het *Pseudorabies virus*.²⁶

Cellijnen

De in het productieproces gebruikte cellen betreffen insectencellijnen afkomstig van de vlinderachtigen *Spodoptera frugiperda* (Sf158, Sf21, Sf9), *Trichopulsia ni* (Tn, High Five), *Spodoptera exigua* (Se301), *Bombyx mori* (Bm36) en *Mamestra brassicae* (Mb). Dit zijn standaardcellijnen die routinematig worden gebruikt in baculovirusexpressiesystemen.

3. Advies

Voor de risicoanalyse zijn de volgende aspecten van belang: de kans op lekkage en verspreiding van het ggo uit de MI-III ruimte, en de aard van het ggo.

De ggo's die opgekweekt zullen worden ter expressie en productie van het CSFV E2 eiwit en het PCV manteleiwit betreffen gg-baculovirusexpressievectoren gebaseerd op het AcMNPV. Met deze systemen is in de afgelopen jaren wereldwijd veel ervaring opgedaan. Baculovirussen kunnen alleen specifieke vlinderachtigen infecteren. Deletie van het *polyhedrine* of *p10* gen leidt tot een sterke mate van biologische inperking. Er zijn geen redenen om aan te nemen dat de insertie van de CSFV E2 en PCV manteleiwit genen leidt tot een verhoogde pathogeniteit van de baculovectoren. De geïnfecteerde insectencellen kunnen niet overleven buiten het kweekmedium.

De COGEM heeft eerder de betreffende SUB als veilig beoordeeld voor werkzaamheden in een MI-III ruimte. De aanvrager voert een integriteitstest uit op de SUB voor aanvang van de kweek van de ggo's. Open handelingen worden niet uitgevoerd. De aanvrager heeft aangegeven geen werkzaamheden met scherpe voorwerpen bij de SUB uit te voeren. Verder zijn conform de werken inrichtingsvoorschriften van een MI-III procesinstallatie een opvangbak aanwezig om het ggo bij eventuele lekkages op te vangen en thermisch te desinfecteren. De SUB zal na de kweek van het ggo gesteriliseerd worden middels een gevalideerde methode.

Gezien het bovenstaande acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden op MI-III niveau verwaarloosbaar klein.

Referenties

- 1 COGEM (2010). Advies grootschalige productie monoklonale antistoffen in een Single-Use Bioreactor. CGM/100503-01
- 2 COGEM (2011). Commerciële productie van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in een Single-Use Bioreactor onder MI-I condities. CGM/110110-02
- 3 COGEM (2011). Grootschalige productie van melkzuur door genetisch gemodificeerde cyanobacteriën in een kweekstelsel voor eenmalig gebruik. CGM/110418-03
- 4 COGEM (2010). Grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in een 'Single-Use Bioreactor'. CGM/101028-03
- 5 COGEM (2006). Grootschalige productie van een vaccincomponent met behulp van baculovirussen en insectencellen. CGM/060518-04
6. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. <http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten%20regelgeving/Regeling-genetisch-gemodificeerde-organismen.pdf> (20-4-2011)
- 7 Kost AT, Condreay JP & Jarvis DL (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology* 23(5): 567-575
- 8 Hitchmann RB, Posse RD & King LA (2008). Baculovirus expression systems for recombinant protein production in Insect cells. *Recent Patents on Biotechnology* 3:46-54
- 9 https://thermoscientific.com/ecommerce/servlet/productscatalog_11152_L10919_80485_-1_4
- 10 Rueda P, Fominaya J, Langeveld JPM, Brusckie C, Vela C & Casal JI (2001). Effect of different baculovirus inactivation procedures on the integrity of porcine parvovirus-like particles. *Vaccine* 19: 726-734
- 11 Fauquet CM *et al* (Eds). *Virus Taxonomy*. Eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam
- 12 Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B & Straus SE (2001). *Fields Virology*. 4e druk. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- 13 Possee RD (1997). Baculoviruses as expression vectors. *Curr Opin Biotechnol* 8: 569-572
- 14 Smith GE, Vlak JM & Summers MD (1982). In vitro translation of *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* early and late mRNAs. *J Virol* 44: 199-208
- 15 Carpentier DCJ, Griffiths CM & King LA (2008). The baculovirus P10 protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus forms two distinct cytoskeletal-like structures and associates with polyhedral occlusion bodies during infection. *Virology* 371: 278-291
- 16 Zhou M, Sun X, Sun X, Vlak JM, Hu Z & Van der Werf W (2005). Horizontal and vertical transmission of wild-type and recombinant *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *J Invertebr Pathol* 89(2): 165-177.
- 17 ACGM compendium of guidance (2000). Guidance from the health and safety commission's advisory committee on genetic modification. Annex III, Guidance on commonly used viral vectors. Internet: HSE <http://www.hse.gov.uk/biosafety/gmo/acgm/acgmcomp/2b3.pdf> (21 april 2006)

- 18 Hamblin M, Van Beek NAM, Hughes PR & Wood HA (1990). Co-occlusion and persistence of a baculovirus mutant lacking the polyhedron gene. *Appl Environ Microbiol* 56(10): 3057-3062
- 19 Wood HA & Granados RR (1991). Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. *Annu Rev Microbiol* 45: 69-87
- 20 Bishop DHL, Entwistle PF, Cameron IR, Allen CJ & Possee RD (1988). Field trials of genetically-engineerde baculovirus insecticides, p. 143-179. In: Sussman *et al*, (Eds). The release of genetically-engineerd microorganisms. Academic Press, Inc., New York
- 21 Vlak JM, Klinkenberg FA, Zaal KJM, Usmany M, Klinge-Roode EC, Geervliet JBF, Roosien J & Van Lent JWM (1988). Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* using a recombinant expressing a p10-galactosidase fusion gene. *J. Gen. Virol.* 69: 765-777
- 22 Gross CH, Russell RL, Rohrmann G F (1994). *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure *J Gen Virol* 75 (5): 1115-1123
- 23 BD Biosciences. Technical data sheet pVL1392 & pVL1393 Baculovirus transfer vector set
- 24 Vlak JM, Usmany M, Belsham GJ, Klinge-Roode EC, Maule AJ, Van Lent J & Zuidema D (1990). Expression of *Cauliflower mosaic virus* gene I using a baculovirus vector bwased upon the p10 gene and a novel selection method. *Virology* 179: 312-320
- 25 COGEM (2006). Classificatie van dierpathogene virussen. Criteria en inperkingsmaatregelen voor pathogeniteitsklassen van dierpathogene virussen. CGM/060420-04
- 26 Van Zijl M, Wensvoort G, de Kluyver E, Hulst M, van der Gulden H, Gielkens A, Berns A, Moormann R (1991). Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J. Virol.* 65(5): 2761-2765