

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw S.A.M. Dijkma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 26 april 2017
KENMERK CGM/170426-01
ONDERWERP Vervolgadvies omlaagschaling van werkzaamheden met gg-VSIV

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een vervolgadvisievraag betreffende de vergunningaanvraag IG 17-038_2.8-000 getiteld: 'Productie van genetisch gemodificeerd *Vesicular stomatitis virus* (gg-VSV)' ingediend door Batavia Biosciences B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is in december 2016 gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor werkzaamheden met VSVΔG-ENV.BG505: genetisch gemodificeerde (gg-) *Vesicular stomatitis Indiana virus* (VSIV) virusdeeltjes die het envelop eiwit (env) van het *Human immunodeficiency virus* (HIV) tot expressie brengen.

In haar advies heeft de COGEM negatief geadviseerd over omlaagschaling van het inperkingsniveau van ML-III naar ML-II aangezien het niet uit te sluiten is dat het gen van het G-eiwit van VSIV tijdens het productieproces door recombinatie teruggeplaatst wordt in het virusdeeltje. De COGEM acht omlaagschaling van werkzaamheden naar ML-II met VSVΔG-ENV.BG505 alleen verantwoord indien er een goed gevalideerde test uitgevoerd wordt waarmee aangetoond wordt dat er geen recombinatie heeft plaatsgevonden.

Naar aanleiding van dit advies heeft de aanvrager additionele testgegevens aangedragen. De COGEM is van oordeel dat deze testgegevens ontoereikend zijn om uit te sluiten dat er geen recombinatie heeft plaatsgevonden bij de productie van VSVΔG-ENV.BG505. Hierbij heeft de COGEM aangegeven welke testgegevens zij noodzakelijk acht om recombinatie uit te kunnen sluiten. De COGEM adviseert om werkzaamheden met VSVΔG-ENV.BG505 op ML-III inperkingsniveau uit te voeren totdat een gevalideerde test om recombinatie uit te sluiten is overlegd en beoordeeld.



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. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Inschaling van werkzaamheden met gg-VSIV

COGEM advies CGM/170426-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Vesicular stomatitis Indiana virus* (gg-VSIV) (IG 17-318). De aanvrager is van plan een gg-VSIV te produceren, waarin het glycoproteïne (G)-eiwit van VSIV is vervangen door het envelopeiwit van het *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1). Dit chimere virus (genaamd VSVΔG-ENV.BG505), wordt vervolgens gepseudotypeerd met het G-eiwit van VSIV of van *Vesicular stomatitis New Jersey virus* (VSNJV). De handelingen zullen worden uitgevoerd ten behoeve van een vaccinontwikkeling tegen HIV. De aanvrager vraagt om de werkzaamheden met VSVΔG-ENV.BG505 en G-eiwit gepseudotypeerd VSVΔG-ENV.BG505 op ML-II uit te voeren, met inachtneming van enkele aanvullende voorschriften. De COGEM was eerder van oordeel (CGM/161221-01) dat tijdens het productieproces van VSVΔG-ENV.BG505 niet uitgesloten kan worden dat er VSIV virusdeeltjes gevormd worden, waarbij door recombinatie het G-eiwit tot expressie komt op gg-VSIV.¹ De COGEM acht de milieurisico's van een omlaagschaling van ML-III naar ML-II alleen verwaarloosbaar klein indien goed gevalideerde testen op recombinanten negatief zijn, en enkele aanvullende voorschriften worden nagevolgd. Om hierover opheldering te verschaffen heeft de aanvrager aanvullende testgegevens aangeleverd om uit te sluiten dat recombinatie plaatsvindt.

2. Het VSIV genoom

Het VSIV heeft een negatief enkelstrengs RNA genoom. Dit genoom codeert voor vijf structurele eiwitten: het nucleoproteïne (N-eiwit), het phosphoproteïne (P-eiwit), het matrixproteïne (M-eiwit), het glycoproteïne (G-eiwit) en het RNA polymerase (L-eiwit).² Het genoom wordt ingepakt in een kogelvormig virusdeeltje. De N, L en P eiwitten vormen een RNA-afhankelijk RNA-polymerase complex dat verantwoordelijk is voor zowel virale transcriptie als replicatie.³ Het G-eiwit vormt samen met het membraan de envelop van het virus. Dit eiwit is verantwoordelijk voor de verankering aan en fusie met de gastheercel. Het M-eiwit heeft een belangrijke rol in de constructie van het virus, virus 'budding' en de apoptose van de cel.

3. Genetisch gemodificeerd VSIV (VSVΔG-ENV.BG505)

De aanvrager wil een gg-VSIV produceren, genaamd VSVΔG-ENV.BG505. Deze virale vector wordt geconstrueerd door het gen dat codeert voor het VSV G-eiwit te verwijderen en te vervangen door de sequentie van het HIV-Env trimeer glycoproteïne. Het HIV *env* gen is geoptimaliseerd voor gebruik in VSIV door onder andere de Env transmembrane en cytoplasmatische domeinen te vervangen door de domeinen afkomstig van VSIV G-eiwit wat resulteert in het *envG* gen.⁴ Deletie van de sequentie van het VSIV G-eiwit heeft tot gevolg dat gg-VSIV niet meer in staat is om te binden aan de gastheercel, maar door de aanwezigheid van het HIV Env-eiwit in VSVΔG-ENV.BG505 kan het virus aan CD4+CCR5+ cellen binden en infecteren.

Ook wil de aanvrager een VSVΔG-ENV.BG505 virus produceren dat gepseudotypeerd is met het VSIV of VSNJV G-eiwit. Het gastheerbereik van het G-eiwit gepseudotypeerd VSVΔG-ENV.BG505 is breder dan voor VSVΔG-ENV.BG505, maar door de pseudotypering is alleen een 'single-round' infectie mogelijk.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in december 2016 geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met replicatiecompetent VSVΔG-ENV.BG505. Zij was van oordeel dat VSVΔG-ENV.BG505 replicatiecompetent is, maar duidelijk minder pathogeen is dan wildtype VSIV aangezien het alleen CD4+/CCR5+ cellen kan infecteren. Echter, de COGEM merkte op dat het theoretisch mogelijk is dat de coderende sequentie van het G-eiwit van VSIV tijdens de productie van de VSVΔG-ENV.BG505 virusdeeltjes door recombinatie in het virale genoom van het gg-VSIV wordt ingebouwd.

5. Voorgenomen werkzaamheden

Productie VSVΔG-ENV.BG505

De aanvrager wil VSVΔG-ENV.BG505 produceren met behulp van VERO cellen, i.e., een cellijn geïsoleerd van nierepitheelcellen afkomstig van een groene meerkat (*Chlorocebus* sp.), en VERT-3 cellen, i.e., VERO cellen die getransfecteerd zijn met een CD4/CCR5 expressiecassette en hierdoor stabiel CD4 en CCR5 tot expressie brengen.

De COGEM veronderstelt dat voor de virusproductie VERO cellen geëlectroporeerd worden met een plasmide met het gemodificeerde VSIV-genoom cDNA, een plasmide coderend voor T7 RNA polymerase om genomisch RNA te synthetiseren, en helperplasmiden die de N-, P-, L-, M- en G-eiwitten van VSIV tot expressie brengen om de virusreproductie te initiëren. Hieruit zal een VSVΔG-ENV.BG505 virus ontstaan dat zowel het HIV Env als het G-eiwit bevat. Vervolgens wordt een 'triple plaque purificatie' toegepast om klonaal VSVΔG-ENV.BG505 te produceren dat alleen het HIV Env bevat. Vanwege de aanwezigheid van het HIV Env-eiwit kan het VSVΔG-ENV.BG505 virus op deze VERT-3 cellen zelfstandig repliceren.

Productie VSVΔG-ENV.BG505 gepseudotypeerd met het VSIV/VSNJV-G eiwit

Na de productie van VSVΔG-ENV.BG505 wordt het virus gepseudotypeerd met het G-eiwit van het VSIV of VSNJV. G-eiwit-gepseudotypeerd VSVΔG-ENV.BG505 wordt verkregen door VERT-3 cellen te infecteren met VSVΔG-ENV.BG505 en deze cellen vervolgens te electroporeren met plasmiden die coderen voor de sequenties van het VSIV-G (pCIneo-del7-VSV-Gin) of VSNJV-G (pCIneo-delT7-VSV-Gnj). Beide G-eiwit plasmiden bevatten volgens de aanvrager geen extra VSIV sequenties. De geëlectroporeerde VERT-3 cellen brengen de G-eiwitten (Gin of Gnj) transiënt tot expressie, waardoor Gin/Gnj-eiwit gepseudotypeerd VSVΔG-ENV.BG505 geproduceerd wordt dat voor klinische studies gebruikt kan worden.

6. Overweging

De aanvrager heeft verscheidene testgegevens aangeleverd om aan te tonen dat er tijdens het productieproces van VSVΔG-ENV.BG505 geen recombinatie optreedt. Het betreft de volgende vier testen:

1) *Virus-propagatie test*

In een virus-propagatie test is bestudeerd in hoeverre VSVΔG-ENV.BG505 zowel de VERO als de Human osteosarcoma (HOS) cellijn kan infecteren, die al dan niet ectopisch CD4 en/of CCR5 tot expressie brengen. Hoewel er geen sprake was van een cytopathisch effect na inoculatie met VSVΔG-ENV.BG505 van VERO cellen zonder CD4 en CCR5 expressie, sluit deze bevinding niet uit dat er geen recombinatie is opgetreden. Het is onduidelijk wat de detectielimiet van deze test is. Door een titratiereeks te doen waarbij bekende hoeveelheden wildtype VSIV of VSVG6-ENV.BG505 (die het G-eiwit tot expressie brengen) worden ‘gespiked’ (toegevoegd) aan bekende hoeveelheden VSVΔG-ENV.BG505 en vervolgens wordt toegevoegd aan de betreffende cellijnen, kan op een kwantitatieve wijze worden ingeschat wat de detectielimiet is van de gebruikte test. Daarnaast ontbreken gegevens over de replicerbaarheid van de uitgevoerde testen.

2) *Virus-neutralisatie test*

In een virus-neutralisatie test is eveneens bestudeerd in hoeverre VERO cellen geïnfecteerd kunnen worden met VSVΔG-ENV.BG505 virusdeeltjes. In deze test worden blockingsantilichamen toegevoegd die binden aan het VSIV-G of de HIV-Env CD4 bindingssite, waardoor infectie van de VERO cellen wordt geremd. Idem aan de bovenstaande testgegevens voor de virus-propagatie test is de detectielimiet en replicerbaarheid van deze test niet duidelijk. De COGEM merkt ook op dat de test uitgevoerd is met 20.000 pfu/ml, hetgeen mogelijk te laag is om de aanwezigheid van recombinant virus aan te tonen.

3) *Western Blotting*

Met behulp van Western Blotting is bestudeerd of VSIV G-eiwit gedetecteerd kan worden in eiwitlysaten van een VSVΔG-ENV.BG505 batch. Hoewel er geen VSIV G-eiwit detecteerbaar was in het VSVΔG-ENV.BG505 eiwitlysaat, is het onduidelijk wat de detectielimiet van het anti-VSIV G-eiwit antilichaam is. De aanvrager vermeldt dat Western Blotting een detectielimiet van 0.1 ng eiwit heeft. Deze informatie lijkt gebaseerd te zijn op ‘common sense’. Er bestaat echter een grote variëteit in de gevoeligheid van antilichamen voor detectie van eiwitten met behulp van Western Blotting, dus er kan niet ‘per default’ aangenomen worden dat het gebruikte anti-VSIV G-eiwit antilichaam een detectielimiet heeft van 0.1 ng eiwit. Net als vermeld voor bovenstaande testgegevens van de virus-propagatie en -neutralisatie testen ontbreekt een kwantitatieve onderbouwing van de aangeleverde gegevens en is de replicerbaarheid onbekend. De kwantificering betreft dan niet alleen de hoeveelheid VSIV G-eiwit dat kan worden aangetoond, maar ook het aantal virusdeeltjes waarmee dit overeenkomt.

4) *Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)*

De aanvrager heeft een 'real time' qPCR uitgevoerd voor de detectie van VSIV G-eiwit coderend plasmide DNA in een VSVΔG-ENV.BG505 batch. De COGEM acht deze test niet zinvol, aangezien de aanwezigheid van plasmide DNA (na RNA isolatie) niet beantwoordt of er RNA recombinitie heeft plaatsgevonden.

Daarnaast heeft de aanvrager een reverse transcriptase qPCR uitgevoerd voor de detectie van RNA coderend voor het VSIV G-eiwit uit een VSVΔG-ENV.BG505 batch. Hoewel deze test geschikt is om RNA coderend voor het VSIV G-eiwit te bepalen, is niet duidelijk wat de detectielimiet van deze test is, alsmede de hoeveelheid virusdeeltjes waarmee dit overeen komt. Ook is niet inzichtelijk of met het gebruikte primerpaar zowel VSV-G Indiana als VSV-G New Jersey geamplificeerd worden.

Om de detectielimiet van een dergelijke reverse transcriptase qPCR te bepalen dient een titratiereeks uitgevoerd te worden waarbij bekende hoeveelheden wildtype VSIV of VSVG6-ENV.BG505 worden 'gespiked' aan VSVΔG-ENV.BG505. Daarnaast dient de replicerbaarheid aangetoond te worden door meerdere VSVΔG-ENV.BG505 batches te testen.

7. Conclusie

De COGEM concludeert dat de aangeleverde testgegevens ontoereikend zijn om te bepalen of er tijdens het productieproces van VSVΔG-ENV.BG505 recombinitie heeft plaatsgevonden waarbij virusdeeltjes gevormd zijn die het VSIV G-eiwit tot expressie brengen. Met name de kwantificering van de verschillende testen, alsmede de replicerbaarheid ervan, zijn onvoldoende om uit te sluiten dat recombinitie naar een virus met een breder tropisme heeft plaatsgevonden. Zolang validatie van bovenstaande testen niet is overlegd, kan de COGEM geen advies uitbrengen omtrent een verlaging van inperkingsniveau voor werkzaamheden met VSVΔG-ENV.BG505 en G-eiwit gepseudotyperend VSVΔG-ENV.BG505.

De COGEM acht de volgende gevalideerde testen noodzakelijk om te bepalen of recombinitie heeft plaatsgevonden:

- Een (meerstaps) virus-propagatie test in wildtype VERO of HOS cellen. Deze test kan gevalideerd worden door bijvoorbeeld VSVΔG-ENV.BG505 te 'spiken' met wildtype VSIV of met VSVG6-ENV.BG505 (in een range tot 10^6 :1 of 10^8 :1 pfu)
- Een reverse transcriptase qPCR, waarbij niet plasmide DNA, maar RNA van bekende hoeveelheden wildtype VSIV of VSVG6-ENV.BG505 (geïsoleerd op identieke wijze als dat van VSVΔG-ENV.BG505) als standaard wordt gebruikt en waarbij ook mengsels van VSVΔG-ENV.BG505 'gespiked' met wildtype VSIV of VSVG6-ENV.BG505 als controle geïncubeerd worden
- Verder wijst de COGEM erop dat Western blotting en virus-neutralisatie testen minder geschikte methoden zijn om te bepalen of recombinitie heeft plaatsgevonden

Referenties

1. COGEM (2016). Inschaling werkzaamheden met HIV-Env gepseudotypeerd gg-VSIV. COGEM advies CGM/161221-01
2. Rose JK & Whitt MA (2001). Rhabdoviridae: the viruses and their replication. In Fields Virology. Edited by: Knipe MD and Howley PM. Philadelphia: 1221-1244
3. Lichty BD et al. (2004). Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. Trends. Mol. Med. 10: 210-216
4. Rabinovich S *et al.* (2014). A novel, live-attenuated *Vesicular stomatitis virus* vector displaying conformationally intact, functional HIV-1 envelope trimers that elicits potent cellular and humoral responses in mice. PLoS One. 9:e106597