

Advies betreffende: **Constructie en productie van alphavirusvectoren**

Kennisgever: **Crucell Holland B.V.**

COGEM kenmerk
CGM/040212-02

BGGO nummer
GGO 03-096/2

Datum advies
12 februari 2004

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de omlaagschaling van ML-III naar ML-II inperkingsniveau betreffende handelingen met genetisch gemodificeerde chimere virussen van *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) en *Sindbis virus* (SINV). Het doel van het onderzoek is het ontwikkelen en testen van chimere alphavirus vectoren waarbij gebruik gemaakt is van VEEV en SINV. De aanvrager heeft eerder een vergunning verkregen voor de productie van chimere alphavirus vectoren en de infectie van zoogdiercellen op ML-III niveau (GGO 03-096/1). Inschaling op ML-III niveau heeft destijds plaatsgevonden vanwege het ontbreken van gegevens met betrekking tot het al dan niet ontstaan van replicatie competent virus (RCV) en het ontbreken van gegevens over de pathogeniteit van mogelijke VEEV/SINV RCV's (GGO 03-096/1).

Alphavirussen (Togaviridae)

Zowel het SINV als VEEV behoren tot het genus Alphavirus binnen de familie *Togaviridae* (1). Alphavirussen hebben deeltjes met een diameter van ongeveer 70 nm. De deeltjes zijn opgebouwd uit een nucleocapside bestaande uit een enkelstrengs RNA genoom van 11.000 tot 12.000 nucleotiden en een capsid eiwit; dit nucleocapside is omgeven door een lipide membraan waarin twee glycoproteïnen (E1 en E2) als 'spikes' uitsteken. Het alphavirusgenoom codeert voor twee polyproteïnen. De niet-structurele genen liggen op het 5' deel van het genoom en worden als een polyproteïne van het RNA vertaald. De structurele eiwitten worden gecodeerd door een leesraam op het 3' einde van het genoom en afgelezen via een subgenomisch mRNA. Verdere processing van de polyproteïnen in functionele eiwitten vindt plaats door virale proteases.

Er zijn in totaal 25 verschillende alphavirussen geïdentificeerd die verschillende diersoorten kunnen infecteren (1, 2). Hoewel SINV en VEEV tot hetzelfde genus behoren vallen ze onder verschillende subgroepen op basis van de E1 aminozuur sequentie (1). Het E1 spike-eiwit is betrokken bij aanhechting en infectie van de gastheercel en speelt derhalve een rol bij het gastheerbereik (1, 3).

Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV)

In 1934 is VEEV voor het eerst geïsoleerd uit de hersenen van paarden met een hersenontsteking (encefalitis). VEEV wordt door muggen, voornamelijk van de soort *Culex melanoconion* spp, verspreid en komt endemisch voor in Centraal- en Zuid-Amerika, Mexico en Florida waar het paarden, ezels, muil dieren en mensen infecteert (3). VEEV is zeer infectieus, maar de lethaliteit is voor volwassen mensen minder dan 10% en voor kinderen tussen de 20 en 30%. Het virus infecteert de hersenen waardoor encefalitis ontstaat. Nagenoeg alle blootgestelde individuen ontwikkelen symptomen. Na blootstelling aan het virus treden binnen 2-5 dagen symptomen op, waaronder hoge

koorts, spierstijfheid, uitgesproken hoofdpijn, fotofobie, spierpijn, misselijkheid, braken en diarree. De ernstige symptomen duren ongeveer 3 dagen waarna een langdurige periode van zwakte en lethargie volgt. De meeste patiënten herstellen na 1 tot 2 weken. Na een doorgemaakte infectie treedt een zeer goede immuniteit op. Tegen het virus bestaan enkele levende geattenueerde vaccins, maar deze zijn niet erg effectief (3). Het VEEV is ingedeeld als een virus van pathogeniteitsklasse 3 (4).

Sindbis virus (SINV)

SINV infecteert vogels, knaagdieren en zoogdieren waaronder mensen. Het virus is voor het eerst in 1952 geïsoleerd uit een mug in Sindbis, Egypte. SINV komt voor in Afrika, Azië, Australië, Midden-Oosten, Oost-Europa, Scandinavië en Rusland. Geïnfecteerde muggen (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex* en *Culiseta* spp.) kunnen het virus op de mens overbrengen. De symptomen zijn plotseling opkomende koorts, huiduitslag, artritis, vermoeidheid, hoofdpijn en spierpijn. De huiduitslag kan voorafgaan aan gewrichtsontstekingen gedurende 10 dagen. Tekenen van geelzucht komen zelden voor. SINV is vrij stabiel en kan tot twee dagen in bloed buiten het lichaam infectieus blijven (3). Het virus is één van de minst gevaarlijke Alphavirussen voor de mens en wordt daardoor vaak gebruikt als een modelsysteem in wetenschappelijk onderzoek (2, 5, 6) Het VEEV is ingedeeld als een virus van pathogeniteitsklasse 2 (4).

Chimeer VEEV/SINV

De aanvrager heeft als doel om chimere alphavirussen te ontwikkelen. Hiertoe is een construct gemaakt dat de niet-structurele genen (nsP1-4) van VEEV bevat die coderen voor het VEE replicase en de 5' in cis gelegen sequenties van VEEV die nodig zijn voor de replicatie. Het 3' uiteinde en het packaging signaal (noodzakelijk voor het inpakken van het RNA in virusdeeltjes) zijn afkomstig van het SINV. Expressie van het transgen wordt aangestuurd door de virale subgenomische promotor. Het construct mist de structurele eiwitgenen. De structurele eiwitten zijn noodzakelijk voor de verdere verspreiding van het virus van cel naar cel. Deletie van de structurele genen maakt dat geen nieuwe virusdeeltjes gevormd kunnen worden en dat het virus beperkt blijft tot de geïnfecteerde cel en feitelijk replicatie-defectief is.

Infectieuze deeltjes worden geproduceerd door cellen te co-transfecteren met RNA van het construct (VEEV/SINV replicon) en twee helper RNA's die coderen voor de structurele genen van SINV. Deze helper RNA's bevatten de in 5' en 3' in cis gelegen uiteinden van VEEV en respectievelijk de E2/E1 glycoproteïnen en het capsid eiwit van SINV. De helper RNA's zijn gedeleteerd voor de niet-structurele eiwitten van VEEV en bevatten geen packaging signaal. Doordat alleen het construct kan amplificeren en de helper RNA's de geschikte packaging signalen missen zullen na co-infectie recombinant replicatie-defectieve alphavirus deeltjes ontstaan waarbij een chimeer RNA van VEEV/SINV ingepakt is in een capsid en een mantel geheel afkomstig van SINV.

De mogelijkheid bestaat echter dat bij de productie van de chimere virussen door recombinatie een replicatie-competent virus (RCV) kan ontstaan met onbekende biologische eigenschappen. De COGEM is gevraagd te adviseren over de risico's van het ontstaan van RCV en over de omlaagschaling van de werkzaamheden met de chimere virussen van ML-III naar ML-II niveau.

Overweging en advies

Handelingen met en productie van chimere virussen worden ingeschaald volgens het principe dat indeling plaats vindt naar de hoogste inschaling van de 'oudervirussen'. Een chimeer alphavirus opgebouwd uit delen van het SINV en VEEV wordt derhalve als pathogeniteitsklasse 3 geclassificeerd. Handelingen met een dergelijk chimeer virus moeten dientengevolge op een ML-3 laboratorium worden uitgevoerd. Indien echter het recombinant virus zich niet kan repliceren en verspreiden (replicatie-deficiënt) vindt inschaling op een lager niveau plaats.

In het onderhavige geval is destijds een vergunning op ML-III niveau afgegeven omdat onduidelijk was of er mogelijk replicatie-competent virus (RCV) gevormd kon worden. Het ontstaan van RCV is afhankelijk van de mogelijkheid tot recombinatie tussen het chimere virusconstruct en de helper RNA's. Het gebruikte systeem voor de productie van viruspartikels is gebaseerd op een VEEV-replicon in combinatie met twee aparte helper RNA's die de structurele eiwitten van SINV tot expressie brengen. Aangezien de homologie tussen het replicon en de helper RNA's tot een minimum beperkt is, en de structurele eiwitten door twee aparte RNA's worden gecodeerd is de kans op recombinatie waarbij RCV zou kunnen ontstaan uiterst gering. De kans op het optreden van recombinatie is immers afhankelijk van de mate van sequentie-overeenkomst en er zijn twee onafhankelijk 'recombinatiegebeurtenissen' nodig. De afwezigheid van RCV wordt ondersteund door de (vertrouwelijke) informatie die de aanvrager heeft aangeleverd.

Hierbij dient opgemerkt te worden dat de biologische eigenschappen en het fenotype van de chimere virussen moeilijk voorspelbaar zijn. Het is niet geheel uit te sluiten dat een mogelijk chimeer RCV langzamer replicateert dan beide oudervirussen waardoor het onopgemerkt blijft in de gebruikte RCV test. Tevens is de kwaliteit van de overlegde gegevens betreffende de RCV test onvoldoende om de getrokken conclusies volledig te kunnen onderschrijven. Anderzijds wordt de virulentie van VEEV grotendeels bepaald door de structurele eiwitten. In het hier gebruikte VEEV/SINV systeem wordt gebruikt gemaakt van de structurele eiwitten van het veel minder gevaarlijke SINV. Daarbij is het bekend van andere chimere togavirussen dat ze in staat zijn in cellijnen tot een hoge titer te repliceren maar dat ze geattenuëerd zijn in proefdieren (7, 8, 9).

De toegevoegde waarde van ML-III t.o.v. ML-II is met name gericht op milieu aspecten (ontsnappen) en niet zozeer op persoonlijke veiligheid. Gezien de aard van werkzaamheden (gebruik van zoogdiercellen) en de uitermate geringe kans op het ontstaan van RCV lijkt de kans op verspreiding naar het milieu uiterst gering. De veiligheid voor de laboratoriumwerker is onder ML-III nauwelijks of niet anders dan onder ML-II omstandigheden.

Advies

Op grond van het feit dat het ontstaan van RCV zeer onwaarschijnlijk is, de aard van de werkzaamheden en de verwachting dat het chimere virus geattenuëerd is ten opzichte van de oudervirussen, is de COGEM van mening dat voor de genoemde werkzaamheden (zoals genoemd in beschikking GGO 03096/2, lid 7 en 8) bij omlaagschaling van ML-III naar ML-II de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Weaver, S.C. et al., (2000). Family Togaviridae in Virus taxonomy, Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses, eds: Van Regenmortel, M.H.V. et al. Academic Press, San Diego. p879-889.
2. Berglund, P., Tubulekas, I., Liljestrom, P. (1996). Alphaviruses as vectors for gene delivery. Trends Biotechnol. 14: 130-134
3. Knipe, M.D., Howley, P.M. (2001) Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
4. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze Regeling 1998.
5. Polo, J. M., Belli, B.A., Driver, D.A., Frolov, I., Sherrill, S., Hariharan, M.J., Townsend, K., Perri, S., Mento, S.J., Jolly, D.J., Chang, S.M., Schlesinger, S., Dubensky, T.W. (1999). Stable alphavirus packaging cell lines for Sindbis virus and Semliki Forest virus-derived vectors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 4598-603.
6. Dubensky, T.W., Driver, D.A., Polo, J.M., Belli, B.A., Latham, E.M., Ibanez, C.E., Chada, S., Brumm, D., Banks, T.A., Mento, S.J., Jolly, D.J., Chang, S.M.(1996). Sindbis virus DNA-based expression vectors: utility for in vitro and in vivo gene transfer. J. Virol. 70: 508-519.
7. Paessler, S., Fayzulin R.Z., Anishchenko, M., Greene I.P., Weaver S.C., Frolov, I. (2003). J. Virology 77: 9278-9286.
8. Kuhn, R.J., Griffin, D.E., Owen, K.E., Niesters, H.G.M., Strauss, J.H. (1996). Chimeric sindbis-ross viruses to study interactions between alphavirus nonstructural and structural regions. J. Virology 70: 7900-7909.
9. Schoepp, R.J., Smith, J.F., Parker, M.D. (2002). Recombinant chimeric western and equine encephalitis viruses as potential vaccine candidates. Vrology 302: 229-308