

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 2 juni 2009
KENMERK CGM/090602-01
ONDERWERP Advies inschaling lentiviraal productiesysteem met heterologe oppervlakte-eiwitten

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van vergunningaanvraag IG 09-019 betreffende 'Gebruik van retroviraal pseudo-partikel systeem met heterologe virale oppervlakte eiwitten' van Crucell Holland B.V., adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van de productie van, en werkzaamheden met, op HIV-1 gebaseerde pseudopartikels met heterologe virale oppervlakte-eiwitten. Voor de productie van lentivirale vectoren zijn in de loop der tijd verschillende productiesystemen ontwikkeld om de veiligheid te verhogen. Het in deze aanvraag gebruikte productiesysteem is vergelijkbaar met een eerste generatie lentiviraal productiesysteem, omdat alle HIV-gensequenties aanwezig zijn in het provirale genoom. Bij derde generatie productiesystemen zijn zowel recombinaties als mutaties nodig voor herstel van het provirale genoom, terwijl bij het onderhavige productiesysteem mutaties zouden kunnen leiden tot een replicerend en infectieus virusdeeltje.

De virale genen *env*, *vpr* en *nef* zijn in dit productiesysteem uitgeschakeld door middel van inserties. Het gen *env* codeert voor het HIV oppervlakte-eiwit dat nodig is voor herkenning van cellen en daarmee voor infectie. Het leesraam van het *env* gen is verstoord, maar zou hersteld kunnen worden door een mutatie in het gen. De kans dat deze mutatie zich voordoet tijdens productie en transductie is reëel aanwezig. De accessoire genen *vpr* en *nef* zijn non-functioneel. Zij zijn niet essentieel voor infectie, maar belangrijk voor replicatie. Afwezigheid van de Vpr en Nef eiwitten zal niet leiden tot een replicatie- en infectiedeficient virus.

Daarnaast kan niet uitgesloten worden dat er replicatie-competente virusdeeltjes aanwezig zijn in de geproduceerde virusbatch.

Omdat er een reële kans is dat het leesraam van het *env* gen hersteld wordt tijdens productie of transductie, adviseert de COGEM, in overeenstemming met het eerder opgestelde generieke advies over lentivirale productiesystemen, de voorgenomen experimenten uit te voeren op ML-III inperkingsniveau. Vanwege de kans op het ontstaan van replicatie-competent virus, adviseert de COGEM tevens aanvullende maatregelen om prikaccidenten te voorkomen, zoals het vermijden van het gebruik van scherpe voorwerpen tijdens de werkzaamheden.

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

Inschaling van werkzaamheden met een lentiviraal productiesysteem met heterologe oppervlakte-eiwitten

COGEM advies CGM/090602-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de productie en het gebruik van op HIV-1 gebaseerde pseudopartikels met verschillende heterologe virale oppervlakte-eiwitten. De werkzaamheden betreffen het produceren van virusdeeltjes in animale cellen en het infecteren van cellijnen met de geproduceerde, defectieve virusdeeltjes. Deze virusdeeltjes kunnen cellen infecteren, maar bevatten niet alle informatie om opnieuw een infectieus virusdeeltje te maken. Twee tot vier dagen na infectie zullen de cellen worden gelyseerd en zal luciferase-expressie worden gemeten als maatstaf voor succesvolle infectie. De aanvraag is gedaan in het kader van onderzoek naar neutraliserende antilichamen tegen oppervlakte-eiwitten en interacties van verschillende oppervlakte-eiwitten met cellulaire receptoren.

Lentivirale vectoren

Lentivirale vectoren zijn afgeleid van lentivirussen en behoren tot de familie van retrovirussen (*Retroviridae*, genus *Lentivirus*). Dit type vectoren wordt veelvuldig gebruikt als gentransfersysteem omdat het stabiel integreert in het genoom van de geïnfecteerde cel en omdat het zowel delende als niet-delende cellen kan infecteren.^{1,2,3,4}

Als basis voor de in deze aanvraag beschreven lentivirale vectoren wordt gebruik gemaakt van het genoom van het *Human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1). Het genoom van HIV-1 bevat drie structurele genen *gag*, *pol* en *env*. Het gen *gag* codeert voor de matrix- en kapsel-eiwitten en de nucleoproteïnen van het virus. Het gen *pol* codeert voor de enzymen nodig voor replicatie en integratie van het virale genoom. Het gen *env* codeert voor het oppervlakte-eiwit dat nodig is voor herkenning van cellen en daarmee infectie. Daarnaast bevat het genoom vier accessoire genen (*vif*, *vpr*, *vpu* en *nef*) en twee regulatoire genen (*tat* en *rev*), die belangrijk zijn voor replicatie en virulentie van het virus. Het lentivirale genoom bevat aan weerszijden zogenaamde *Long Terminal Repeats* (LTRs) die betrokken zijn bij replicatie en transcriptie.⁵

Het lentivirale productiesysteem uit de onderhavige aanvraag bestaat uit twee plasmiden. Het eerste plasmide, het virale construct pNL4.3.LucRE⁻, bevat het provirale genoom van HIV-1. In dit genoom zijn enkele mutaties aangebracht. Van de genen *env* en *vpr* is het leesraam verstoord door insertie van enkele nucleotiden in het gen.⁶ Van het gen *nef* zijn de eerste 102 basenparen verwijderd en is op de plek van de deletie het luciferasegen geïnserteerd.⁷ De drie gemuteerde genen produceren geen functioneel viraal eiwit.

Het tweede plasmide (de 'pseudotyping' vector) codeert voor de oppervlakte-eiwitten die nodig zijn voor herkenning van het virus door gastheercellen. De aanvrager zal een plasmide gebruiken met een CMV promoter met daarachter één van de volgende oppervlakte-eiwitten;

Hepatitis C virus E1 en E2, *Vesicular stomatitis virus* glycoproteïne G eiwit, glycoproteïne E eiwit van verschillende Ebolavirussen, glycoproteïne M eiwit van twee Marburgvirussen en hemagglutinine eiwit van verschillende influenzavirussen.

De productie van de pseudopartikels zal plaatsvinden in humane cellijnen (293T, PER.C6). Hiertoe worden het virale construct pNL4.3.LucR^E en het expressieplasmide voor de oppervlakte-eiwitten gecotransfecteerd in deze cellen. Het virale construct wordt afgelezen en gekopieerd en de resulterende RNA moleculen worden ingepakt in het virusdeeltje. De geproduceerde oppervlakte-eiwitten worden geïncorporeerd in het virusmembraan dat het deeltje omhult. De resulterende lentivirale vector is een op HIV-1 gebaseerde pseudopartikel met oppervlakte-eiwitten van verschillende virale herkomst. Het HIV-eigen oppervlakte-eiwit *env* ontbreekt in het pseudopartikel. Infectie is mogelijk van bepaalde typen cellen, afhankelijk van het geïncorporeerde oppervlakte-eiwit.

De virusdeeltjes worden geoogst en gebruikt voor eenmalige infectie van cellijnen (Huh-7, 293T, PER.C6, A549, MDCK en Hela). De geïnfecteerde cellen zullen twee tot vier dagen na de infectie worden gelyseerd en de luciferase-expressie zal worden gemeten. Na deze ronde van infectie zal een virusdeeltje ontstaan dat geen oppervlakte-eiwitten heeft. Dit virusdeeltje is niet in staat om gastheercellen te herkennen en is daarom niet infectieus.

Eerder COGEM advies

In het verleden heeft de COGEM verscheidene malen geadviseerd over de productie van en werkzaamheden met lentivirale vectoren. Lentivirussen zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3 en daaruit volgt dat werkzaamheden met lentivirussen op ML-III niveau plaats moeten vinden. Werkzaamheden met verbeterde lentivirale productiesystemen en veiligere vectoren kunnen in aanmerking komen voor omlaagschaling als voldaan wordt aan bepaalde voorwaarden. De COGEM heeft over deze inschaling een advies uitgebracht.⁸

In dit generieke advies wordt een onderscheid gemaakt tussen verschillende generaties productiesystemen. Een eerste generatie lentiviraal productiesysteem bestaat uit de volgende drie plasmiden: een packagingconstruct dat het packagingsignaal mist en dat, afgezien van *env*, alle lentivirale genen bevat; een transfervector die het gewenste transgen en het packagingsignaal bevat; en een pseudotyping vector die een envelop-eiwit tot expressie brengt. Er zijn twee recombinaties nodig tussen deze plasmiden om tot een replicatie-competent lentivirus (RCL) te komen. Vanwege de kans op RCL en de aanwezigheid van de accessoire genen worden alle *in vitro* werkzaamheden met eerste generatie lentivirale vectoren ingeschaald op ML-III niveau.

In een tweede generatie lentiviraal productiesysteem zijn naast het packagingsignaal en het *env* gen ook de accessoire genen *vif*, *vpr*, *vpu* en *nef* verwijderd uit het packagingconstruct. Vanwege de kleine maar reële kans op de vorming van RCL wordt de productie van virussen op ML-III niveau ingeschaald. De vectorbatch die gebruikt wordt voor transductie zou RCL kunnen bevatten als gevolg van recombinaties tijdens productie. Indien de vectorbatch negatief is getest op de aanwezigheid van RCL kan de transductie op ML-II niveau uitgevoerd worden met de volgende aanvullende voorwaarden:

- tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;

- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd;
- de te transduceren cellen dienen vrij te zijn van lentivirussen met een relevant tropisme voor de gastheercel;
- tussen handelingen met replicatie-competente lentivirussen of andere lentivirale vectorsystemen en handelingen met de lentivirale vector in hetzelfde veiligheidskabinet dient een marge van minimaal 30 minuten gehanteerd te worden.

In een derde generatie lentiviraal productiesysteem zijn naast het packaging-signaal, het *env* gen en de vier accessoire genen, ook de regulatoire genen *tat* en *rev* verwijderd uit het packaging-construct. Ook zijn de LTRs verwijderd. De veiligheid van deze generatie productiesystemen is zodanig dat productie van, en transductie met, virusdeeltjes op ML-II niveau plaats kunnen vinden onder aanvullende voorwaarden.

De COGEM heeft niet eerder advies uitgebracht over een lentiviraal productiesysteem met twee plasmiden, waarbij bijna alle virale genen met de vector worden overgedragen.

Overweging

De productie van en de werkzaamheden met op HIV gebaseerde virusdeeltjes brengen risico's met zich mee. Door mutaties en recombinaties zouden replicatie-competente virusdeeltjes kunnen ontstaan, die in staat zijn mensen te infecteren en zich te verspreiden in het milieu. Om een uitspraak te doen over de inschaling van het lentivirale productiesysteem uit de onderhavige aanvraag en de werkzaamheden met daarmee geproduceerde virusdeeltjes, zullen de eigenschappen van het productiesysteem en de geproduceerde virusdeeltjes worden beoordeeld.

Het lentivirale productiesysteem uit de onderhavige aanvraag bestaat uit twee plasmiden: het virale construct en het pseudotyping construct. Dit productiesysteem mist een transfervector met packaging-signaal en LTRs. Het virale construct bevat het bijna complete wildtype provirale genoom van HIV-1 inclusief deze LTRs en packaging-signaal. Het ontstaan van replicatie-competente virusdeeltjes is daarom mogelijk zonder dat recombinaties tussen plasmiden nodig zijn.

In het systeem zijn drie genen uitgeschakeld, zodat ze geen functioneel eiwit meer kunnen produceren. Aan de genen *env* en *vpr* zijn nucleotiden toegevoegd, zodat het leesraam van deze genen is verstoord. Het eerste gedeelte van het *nef* gen is verwijderd en het luciferase gen is op de plek van de deletie ingebracht. Dit is de enige deletie in het provirale HIV genoom ten opzichte van wildtype HIV.

Het productiesysteem bezit de volledige sequentie van *env* in het virale construct. Omdat slechts het leesraam van *env* is verstoord, kan door een mutatie die dit leesraam herstelt functionele Env oppervlakte-eiwitten geproduceerd worden.

In het productiesysteem zijn de twee accessoire genen *vpr* en *nef* uitgeschakeld door middel van inserties, zodat de sequenties van deze genen, voor *vpr* geheel en voor *nef* grotendeels, aanwezig zijn in het provirale genoom. Herstel van de functionaliteit van *vpr* zou kunnen optreden door een mutatie die het leesraam van *vpr* herstelt. Een eventuele deletie van het luciferase gen

resulteert in de expressie van een verkort Nef eiwit wat nauwelijks functioneel is.^{9,10} In totaal zijn er twee mutaties mogelijk ter herstel van functionaliteit van HIV.

De accessoire genen zijn belangrijk voor replicatie en transcriptie *in vivo*, maar beïnvloeden de eerste stappen van infectie niet.^{9,10,11} Dit houdt in dat HIV zonder *vpr* en *nef*, maar met *env* kan infecteren en repliceren in humane cellen. Er is geen recombinatie en slechts één mutatie nodig om dit virus te verkrijgen. Daarnaast zijn er twee mutaties nodig om HIV met *env* en *vpr*, maar zonder *nef* te verkrijgen. Van dit laatste virus is bekend dat het mensen kan besmetten en op langere termijn AIDS kan veroorzaken.¹²

Recombinatie tussen het virale construct en het pseudotyping construct zou op kunnen treden zodat een replicatie-competent, infectieus virus ontstaat wat gensequenties heeft die coderen voor een oppervlakte-eiwit. De COGEM acht de kans hierop verwaarloosbaar klein vanwege het ontbreken van homologe sequenties tussen de plasmiden.

Indien de te transduceren cellen lentivirussen bevatten, is recombinatie tussen deze virussen en het defectieve virus mogelijk. Door recombinatie kan een RCL ontstaan. Ook is tijdelijke complementatie in trans mogelijk als het defectieve virusdeeltje en een ander lentivirus zich samen in een cel bevinden. De doelcellen dienen daarom voor een eventuele omlaagschaling vrij te zijn van lentivirussen.

Conclusie en advies

Inschaling van productie van op HIV gebaseerde pseudopartikels

De productie van HIV pseudopartikels zal plaatsvinden in humane cellijnen. Omdat het productiesysteem uit twee plasmiden bestaat en de sequentie van *env* nog aanwezig is in het HIV genoom, volstaat een mutatie in *env* om een replicatie-competent virusdeeltje te krijgen. De biologische inperking die bereikt wordt door het gebruik van meerdere plasmiden, is in dit systeem niet aanwezig.

De kans dat er tijdens het productieproces van de virusdeeltjes een reversie van een mutatie in het virale construct pNL4.3.LucRE⁻ optreedt is klein. Het transcriptieproces van DNA naar RNA heeft een kleine foutmarge. Het optreden van een reversie van een mutatie tijdens transcriptie is echter niet uit te sluiten.

Daarnaast is het mogelijk dat al gevormde virussen tijdens de productiefase de productiecellen infecteren. Tijdens de reverse transcriptie van het RNA genoom is er een hoge foutfrequentie, waardoor mutaties kunnen ontstaan. Indien het leesraam van *env* wordt hersteld ontstaat er een replicatie-competent HIV-deeltje. De accessoire genen *vpr* en *nef* zullen niet functioneren, waardoor de replicatie van dit virus minder efficiënt zal zijn. Echter, infectie kan optreden, waarna mutaties in de accessoire genen ervoor kunnen zorgen dat er HIV ontstaat met verbeterde replicatie.

Omdat niet uit te sluiten is dat het leesraam van het *env* gen hersteld wordt tijdens productie, adviseert de COGEM, in overeenstemming met haar eerdere generieke advies,⁸ productie van pseudopartikels met het productiesysteem uit de aanvraag uit te voeren op ML-III inperkingsniveau. Vanwege de kans op het ontstaan van replicatie-competent virus, adviseert de

COGEM tevens aanvullende maatregelen om prikaccidenten te voorkomen, zoals het vermijden van het gebruik van scherpe voorwerpen tijdens de werkzaamheden.

Inschaling van handelingen met op HIV gebaseerde pseudopartikels

Na het oogsten van de geproduceerde virussen zal transductie van humane cellijnen met deze HIV pseudopartikels plaatsvinden. De geïnfecteerde cellen zullen worden gebruikt voor analyse. De aanvrager geeft niet aan dat de geproduceerde virussen getest zullen worden op de aanwezigheid van RCLs. Daarom is het niet uit te sluiten dat er replicatie-competente, infectieuze virusdeeltjes aanwezig zijn in de virusbatch die zich tijdens transductie kunnen vermeerderen.

Bovendien is er tijdens de transductie een reële kans op reversie van de mutatie in *env*, omdat de foutfrequentie tijdens reverse transcriptie hoog is.

Recombinatie en complementatie tussen andere lentivirussen en defectieve pseudopartikels is mogelijk indien de doelcellen voor transductie niet vrij zijn van lentivirussen. De aanvrager geeft aan dat de doelcellen lentivirus-vrij zullen zijn, maar overlegt hier geen ondersteunende data voor.

Op grond van bovenstaande argumenten adviseert de COGEM, in overeenstemming met het eerder opgestelde advies,⁸ om de handelingen met pseudopartikels geproduceerd met het beschreven productiesysteem uit te voeren op ML-III inperkingsniveau. Vanwege de kans op het ontstaan van replicatie-competent virus, adviseert de COGEM tevens aanvullende maatregelen om prikaccidenten te voorkomen, zoals het vermijden van het gebruik van scherpe voorwerpen tijdens de werkzaamheden.

Referenties

1. Delenda C. (2004). Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* 6 Suppl 1: S125-S138
2. Romano G. (2005). Current development of lentiviral-mediated gene transfer. *Drug News Perspect.* 18: 128-134
3. Vigna E. & Naldini L. (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med* 2: 308-316
4. Naldini L. *et al.* (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272: 263-267
5. Van Regenmortel MHV (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego
6. Connor RI *et al.* (1995). Vpr is required for efficient replication of Human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* 206: 935-944
7. Chen BK *et al.* (1994). Distinct modes of Human immunodeficiency virus type 1 proviral latency revealed by superinfection of nonproductively infected cell lines with recombinant luciferase-encoding viruses. *J. Virology* 86: 654-660
8. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. Advies CGM/090331-03

9. Papkalla A *et al.* (2002). Nef enhances human immunodeficiency virus type 1 infectivity and replication independently of viral coreceptor tropism. *J Virol* 76: 8455-8459
10. Carl S *et al.* (2000). Partial 'repair' of defective NEF genes in a long-term nonprogressor with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 181: 132-140
11. Rouzic Le E & Benichou S. (2005) The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology* 22: 2-11
12. Gorry PR *et al.* (2007). Replication-dependent pathogenicity of attenuated *nef*-deleted HIV-1 *in vivo*. *J Acquir Immune Defic Syndr* 46: 390-394