

Recombinant influenzavirus als vector voor hiv-antigenen

A.L. de Goede ^{ab*}, P.H.M. Boers ^b, L.J.M. Dekker ^c, A.G. Vulto ^a,
A.D.M.E. Osterhaus ^b, G.F. Rimmelzwaan ^b en R.A. Gruters ^b

^a Apotheek, Erasmus MC, Rotterdam.

^b Viroscience lab, Erasmus MC, Rotterdam.

^c Afdeling Neurologie, Erasmus MC, Rotterdam.

* Correspondentie: a.l.degoede@erasmusmc.nl.

KERNPUNTEN

- Virale vectorsystemen worden onderzocht voor therapeutische vaccinatie bij hiv-infectie.
- Influenzavirus is gebruikt als vector voor hiv-antigeen p17. De recombinante vector (afgekort rFlu-p17) is gekarakteriseerd.
- LC-MS/MS is een waardevolle techniek voor het aantonen van eiwitexpressie van recombinante vectoren.
- rFlu-p17 activeert hiv-specifieke T-cellen *in vitro* en hiv-specifieke antilichamen *in vivo* in muizen.
- Virale vectoren zijn geavanceerde geneesmiddelen waarmee apothekers in de toekomst te maken zullen krijgen.

Inleiding

Hiv-replicatie kan onderdrukt worden met antivirale therapie, wat een verbetering geeft van overleving en kwaliteit van leven bij hiv-geïnfecteerde patiënten. Therapeutische vaccinatie zou een alternatief kunnen zijn voor antivirale geneesmiddelen, die chronisch gebruikt moeten worden en bijwerkingen hebben. Therapeutische vaccins hebben als doel de virusrelicatie af te remmen door het versterken van bestaande of het opwekken van nieuwe hiv-specifieke immuniteit. Bij therapeutische vaccinatie, ook wel aangeduid als immuuntherapie, wordt een deel van de ziekteverwekker, het immunogeen, gebruikt om extra humorale of cellulaire immuniteit te genereren [1].

Het immunogeen kan aangeboden worden met een vector als drager van het genetisch materiaal. Virale vectoren, bijvoorbeeld het influenzavirus, zijn aantrekkelijke kandidaten omdat ze eenvoudig te construeren zijn, een sterke humorale en cellulaire immuniteit opwekken en eenvoudig toe te dienen zijn. Het doel van dit onderzoek was het construeren van recombinant influenzavirus als vector voor hiv-antigenen en het karakteriseren van de immunogene eigenschappen van deze vector.

Methoden

De virale vectoren zijn gegenereerd uit gensegmenten van influenzavirus (Flu) [2] waarbij het neuraminidase-gen werd vervangen door een hiv-antigeen of controle-antigeen. Dit resulteerde in een recombinante vector met het hiv-antigeen p17 (aangeduid als

ABSTRACT

Recombinant influenza virus as a vector for HIV antigens

OBJECTIVE

To develop a recombinant influenza virus as a vaccine vector for HIV antigen p17. To characterize the protein expression from the antigen inserted in the vector and to investigate the capacity of the vector to activate T cells *in vitro* and to induce antibody formation *in vivo*.

DESIGN AND METHODS

The recombinant influenza vector for HIV antigens was constructed from eight influenza gene segments by molecular biology techniques. The influenza neuraminidase gene was replaced by the HIV antigen of interest. Protein expression from the construct was analyzed by western blot and by LC-MS/MS. Antigen-presenting cells were infected with the viral vector and co-cultured with T cells and T-cell activation was measured by cytokine production. The presence of antibodies specific for HIV in serum of mice vaccinated with the vector was analyzed by antibody assays.

RESULTS

HIV antigens are expressed from the constructed recombinant influenza vector. Both the conventional western blot analysis and the more flexible LC-MS/MS method are suitable for detection of antigen expression from a viral vector. Antigen-presenting cells infected with the viral vector are able to present the HIV antigen to T cells through which HIV-specific T cells become activated. Mice immunized twice with the vector developed antigen-specific antibody responses.

CONCLUSION

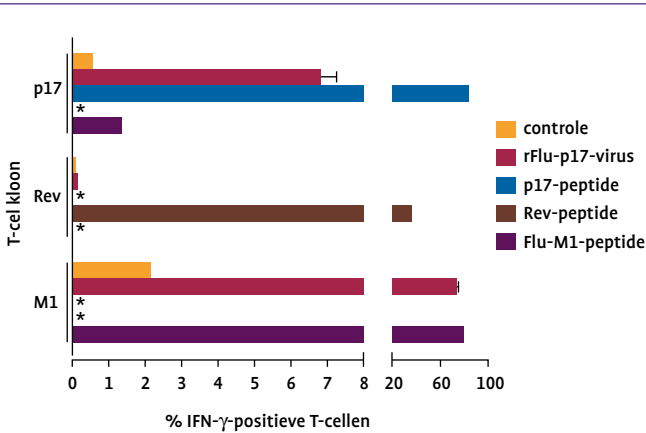
HIV antigens inserted into recombinant influenza are expressed from the viral vector, can activate antigen-specific T cells *in vitro* as well as induce antibody formation *in vivo*. Recombinant influenza viruses are promising vector candidates that may be used for the induction of antibody and T-cell mediated immune responses.

de Goede AL, Boers PHM, Dekker LJM, Vulto AG, Osterhaus ADME, Rimmelzwaan GF, Gruters RA. Recombinant influenzavirus als vector voor hiv-antigenen. PW Wetenschappelijk Platform. 2013;7:a1332.

Dit artikel is een bewerkte vertaling van: de Goede AL, Boers PH, Dekker LJ, Osterhaus AD, Gruters RA, Rimmelzwaan GF. Characterization of recombinant influenza A virus as a vector for HIV-1 p17Gag. Vaccine. 2009 sep 25;27(42):5735-9.

FIGUUR 1

Activatie van specifieke CD8-positieve T-cellen door B-cellen die zijn geïnfecteerd met rFlu-p17



In CD8-positieve T-cellen met specificiteit voor hiv-p17 en hiv-Rev en voor influenzavirusmatrix (M1) werd intracellulair interferon gamma (IFN- γ) bepaald na stimulatie met B-cellen die waren geïnfecteerd met rFlu-p17 of waren opgeladen met peptiden zoals aangegeven in de legenda. Combinaties aangeduid met * zijn niet getest. De standaardfout van het gemiddelde van twee flow-cytometrische analyses is weergegeven met een foutenbalk.

rFlu-p17), een vector met het hiv-antigeen Rev (rFlu-Rev) en een controlevector met het groen fluorescerende eiwit GFP (rFlu-GFP). Eiwitexpressie van de recombinante vectoren werd bepaald met de western-blot-techniek en met LC-MS/MS. Hiertoe werden in vitro cellen geïnfecteerd met rFlu-p17 of rFlu-GFP. De eiwitten in het cellysaat werden gescheiden met gel-elektroforese, overgebracht op een membraan en zichtbaar gemaakt met monoklonale antilichamen. Voor LC-MS/MS-detectie werd het lysaat van de cellen geprecipiteerd en behandeld met trypsine. Het supernatant werd geanalyseerd op een nanoLC-LTQ Orbitrap MS/MS.

Voor het in vitro aantonen van antigeniteit van de recombinante vectoren werden B-cellen geïnfecteerd met rFlu-p17 of rFlu-Rev. Deze cellen werden gebruikt als antigeenpresenterende cellen voor CD8-positieve T-cellijnen. De geïnfecteerde B-cellen werden samen gekweekt met de T-cellen die specifiek zijn voor p17, Rev of influenzavirus. Als maat voor T-celactivatie werd de productie van interferon gamma (IFN- γ) in de T-cellen gemeten met fluorescent gelabelde antilichamen en geanalyseerd middels flow-cytometrie. In dierexperimenteel onderzoek, getoetst door de lokale dierexperimentencommissie, werden muizen gevaccineerd met rFlu-p17 of rFlu-Rev of een fosfaatgebufferde zoutoplossing. Na vier weken werd een tweede vaccinatie toegediend en één week hierna werd een bloedmonster genomen. Serum werd met een *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) getest op p17-specifieke antilichamen en met een assay voor hemagglutinatieremming (HI) op influenzaspecifieke antilichamen. Voor beide assays werd de eindpuntverduunningstiter bepaald.

Verdere details betreffende de methoden zijn beschreven in de oorspronkelijke publicatie [3].

Resultaten

De hiv-antigenen in de geconstrueerde recombinante influenzavirusvectoren komen tot expressie. Wij hebben met twee verschillende technieken, western-blot en LC-MS/MS, aangetoond dat het p17-eiwit van hiv gevormd wordt in cellen die zijn geïnfecteerd met rFlu-p17. Met LC-MS/MS werd 45% van de aminozuren in de p17-sequentie teruggevonden. Ook werd productie van recombinant Rev aangetoond met LC-MS/MS.

Vervolgens is aangetoond dat B-cellen die zijn geïnfecteerd met rFlu-p17, in staat zijn het p17-antigeen te presenteren aan T-cellen en dat deze T-cellen gestimuleerd worden tot productie van IFN- γ (figuur 1). Na stimulatie met rFlu-p17-geïnfecteerde cellen produceert 6,8% van de p17-specifieke T-cellen IFN- γ , dit is significant meer dan de negatieve controle. Dit is ook het geval wanneer de p17-specifieke T-cellen gekweekt worden in aanwezigheid van de B-cellen die als positieve controle zijn opgeladen met p17-peptide. De Rev-specifieke T-cellen responderen zoals verwacht wel op B-cellen die zijn opgeladen met het corresponderende Rev-peptide (36% van de T-cellen produceert IFN- γ) en niet op rFlu-p17-geïnfecteerde B-cellen als negatieve controle. De influenza-T-cellen worden geactiveerd door B-cellen die zijn opgeladen met influenzapeptide (79% van de T-cellen produceert IFN- γ) en door B-cellen die zijn geïnfecteerd met rFlu-p17 (74% van de T-cellen produceert IFN- γ), want deze B-cellen presenteren niet alleen het hiv-p17-antigeen maar ook influenza-antigenen (figuur 1).

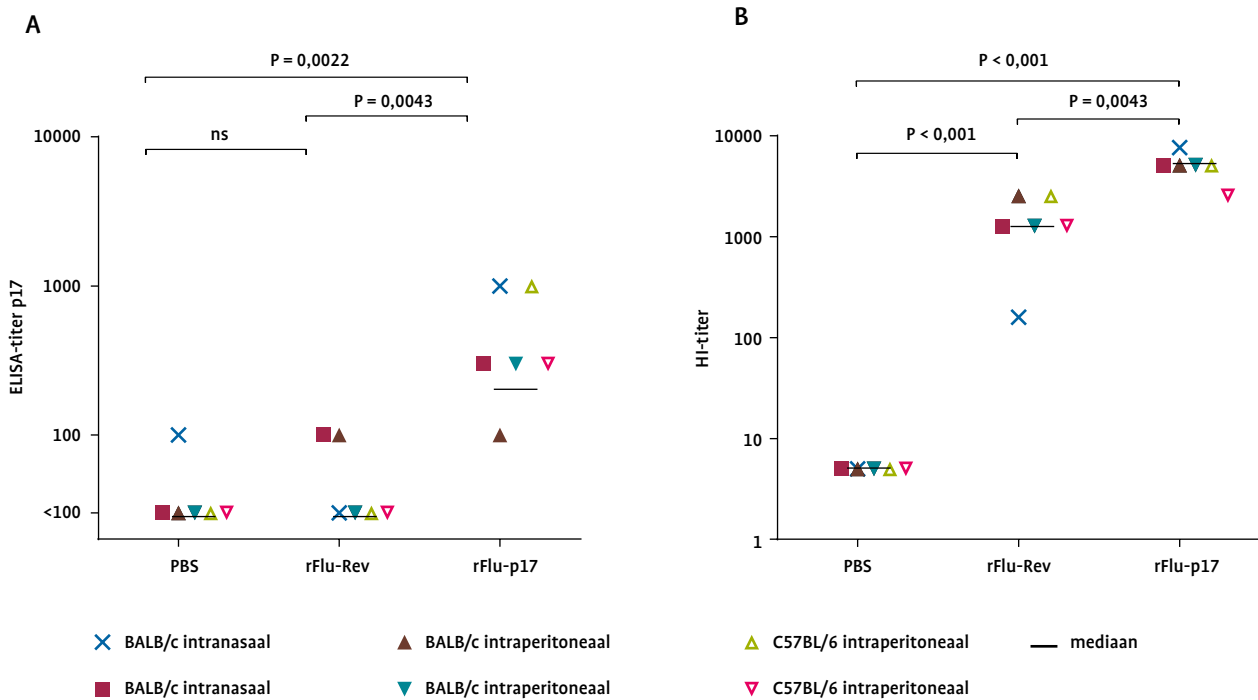
Recombinant Flu-p17 is immunogeen in vivo in muizen. Na twee immunisaties hadden de met rFlu-p17 geïmmuniseerde muizen antilichamen gevormd die gericht zijn tegen hiv-p17 (figuur 2A). Wij konden influenzaspecifieke antilichamen aantonen in de muizen die ofwel rFlu-p17 ofwel rFlu-Rev toegediend gekregen hadden en niet in de groep met fosfaatgebufferde zoutoplossing als negatieve controle. De concentratie antilichamen tegen influenzavirus was significant lager in de groep rFlu-Rev-muizen dan in de groep met rFlu-p17 (figuur 2B).

Beschouwing

Dit is het eerste onderzoek waarbij influenzavirus is gebruikt als vector voor het hiv-antigeen p17. Influenzavirus is een veelbelovende vectorkandidaat omdat het immuunresponsen door zowel antilichamen als door T-cellen kan opwekken. Bovendien is het relatief eenvoudig om recombinant influenzavirus te construeren en te produceren, kan het per inhalatie toegediend worden en is recombinant influenzavirus geregistreerd als influenzavaccin [4]. De toepassing van influenzavirus als vector voor genen van hiv is eerder beschreven [5]. Net als bij de meeste onderzoeken met een virale vector, hebben wij uit veiligheidsoverwegingen een virus geconstrueerd dat niet kan repliceren. Door het grootste deel van het influenza-neuraminidase-gen te vervangen door het hiv-1-antigeen ontstaat een recombinant virus dat cellen kan infecteren en dat intracellulair influenzaviruseiwitten en recombinante eiwitten kan produceren, maar dat geen nieuwe virusdeeltjes kan vrijmaken uit de geïnfecteerde cel.

Uit dit onderzoek is gebleken dat het mogelijk is hiv-antigenen in

FIGUUR 2
Recombinant rFlu-p17 induceert p17-specifieke antilichaamresponsen in twee muizenstammen: BALB/c en C57BL/6



Antilichaamresponsen specifiek voor influenzavirus en voor hiv-p17 na intranasale of intraperitoneale immunisatie met rFlu-p17 en met controles rFlu-Rev en fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS) werden geanalyseerd met een p17-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*; A) en een assay voor hemagglutinatieremming (HI; B). Titers zijn gerapporteerd als eindpuntverdunningswaardes. ns = niet-significant ($P > 0,05$ berekend met de Mann-Whitney non-parametrische test).

het influenzavirus in te brengen. Het ingebrachte hiv-gen komt tot expressie, kan in vitro CD8-positieve T-cellen activeren en induceert in vivo humorale antilichaamresponsen. Expressie van het antigeen werd niet alleen met western-blotting maar ook met LC-MS/MS geanalyseerd. De western-blot is een vaak toegepaste techniek voor de detectie van eiwitten, maar heeft als nadeel dat hij een bewerkelijke methode is en dat antilichamen specifiek voor het te detecteren eiwit beschikbaar moeten zijn. Dat laatste is in de praktijk niet altijd het geval en daarom is er behoefte aan antilichaam-onafhankelijke detectiemethodes. Wij hebben in deze studie laten zien dat met LC-MS/MS eiwitexpressie van een recombinante virale vector aangetoond kan worden. De intracellulaire expressie van het hiv-antigeen uit de vector maakt het mogelijk dat peptidefragmenten op het celmembraan gepresenteerd worden aan CD8-positieve T-cellen. Wanneer deze T-cellen een passende antigeenreceptor hebben, raken zij geactiveerd om geïnfecteerde cellen te lysisen. De hier beschreven vector rFlu-p17 kan inderdaad in vitro CD8-positieve T-cellen activeren. Als afgeleide voor T-celactivatie hebben wij de hoeveelheid intracellulair IFN- γ gemeten. De humorale immunogeniteit in vivo werd aangetoond bij muizen waar na intranasale of intraperitoneale toediening zowel antilichamen gericht tegen het p17-antigeen als

tegen influenzavirus werden aangetoond in bloed. Voor rFlu-Rev werd een lagere titer van influenza-antilichamen gevonden dan voor rFlu-p17, mogelijk doordat insertie van Rev in influenzavirus een negatief effect heeft op de expressie van influenza-eiwitten. Verschillende vormen van immuuntherapie voor hiv zijn de afgelopen decennia onderzocht. Een groot scala aan manieren om het hiv-antigeen aan te bieden is getest, zoals in vivo injectie van geïnactiveerd virus, van plasmide-DNA dat codeert voor hiv-antigeen en van recombinante virale vectoren. Daarnaast staan vaccins in de belangstelling waarbij ex vivo cellen worden opgeladen met het hiv-antigeen (recent besproken in een drietal reviews [1, 6, 7]). Het hier gepresenteerde onderzoek breidt de kennis over toepassing van influenza als een virale vector voor hiv-antigenen uit en beschrijft voor het eerst de constructie van recombinant influenzavirus als vector voor hiv-p17 en hiv-Rev. In het huidige onderzoek is de inductie van cellulaire immuniteit niet in vivo onderzocht. Voor een effectieve immuuntherapie is een sterke T-celgedeeldeerde immuniteit waarschijnlijk onontbeerlijk. Deze veronderstelling is gebaseerd op uitgebreid (pre)klinisch onderzoek en onder andere aangetoond in onderzoeken waarin *simian immunodeficiency virus* (een variant van hiv voorkomend in apen) is onderzocht in makaak-apen [8].

De bevindingen van dit onderzoek zijn van belang bij het exploreren van de effectiviteit van virale vectoren voor hiv-vaccinatie in het bijzonder en genterapiestrategieën in het algemeen. Virale vectoren zijn geneesmiddelen en daarom is het voor apothekers nuttig kennis te nemen van ontwikkelingen op dit gebied [9]. De conclusie van dit onderzoek is dat het p17-gen, ingevoegd in recombinant influenzavirus, tot expressie komt, CD8-positieve T-cellen kan activeren en humorale antilichaamresponsen induceert.

Gebaseerd op het registratieonderzoek van A.L. de Goede, R.A. Gruters ontving subsidie van het Aids Fonds. Dit onderzoek werd financieel ondersteund door het VIRGO Consortium, een innovatief cluster van het Netherlands Genomics Initiative.

LITERATUUR

- 1 Pantaleo G, Lévy Y. Vaccine and immunotherapeutic interventions. *Curr Opin HIV AIDS*. 2013 mei;8(3):236-42.
- 2 de Wit E, Spronken MI, Bestebroer TM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA. Efficient generation and growth of influenza virus A/PR/8/34 from eight cDNA fragments. *Virus Res*. 2004 jul;103(1-2):155-61.
- 3 de Goede AL, Boers PH, Dekker LJ, Osterhaus AD, Gruters RA, Rimmelzwaan GF. Characterization of recombinant influenza A virus as a vector for HIV-1 p17Gag. *Vaccine*. 2009 sep 25;27(42):5735-9.
- 4 Sexton A, De Rose R, Reece JC, et al. Evaluation of recombinant influenza virus-simian immunodeficiency virus vaccines in macaques. *J Virol*. 2009 aug;83(15):7619-28.
- 5 Ferko B, Stasakova J, Sereinig S, et al. Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice. *J Virol*. 2001 okt;75(19):8899-908.
- 6 García F, León A, Gatell JM, Plana M, Gallart T. Therapeutic vaccines against HIV infection. *Hum Vaccin Immunother*. 2012 mei;8(5):569-81.
- 7 Vanham G, Van Gulck E. Can immunotherapy be useful as a “functional cure” for infection with Human Immunodeficiency Virus-1? *Retrovirology*. 2012 sep 7;9:72.
- 8 Hansen SG, Ford JC, Lewis MS, et al. Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature*. 2011 mei 26;473(7348):523-7.
- 9 Oostendorp J, de Goede A, Slaper-Cortenbach ICM. Advanced therapy medicinal products – entering the hospital pharmacy arena. *EJHP Practice*. 2010;16(4):53-5.

Nierfunctie bepaling in de apotheek: veelbelovend

Frans van de Vaart

Bij oudere patiënten die geneesmiddelen gebruiken voor diabetes en/of cardiovasculaire aandoeningen, is het vaak nodig de dosering aan te passen wegens verminderde nierfunctie. Hoewel volgens de richtlijnen de nierfunctie van deze patiënten regelmatig moet worden bepaald, gebeurt dat toch maar in 28-75% van de gevallen. Geerts e.a. onderzochten of dat kan door creatininebepaling in de apotheek. Hiervoor werden patiënten geselecteerd die chronisch antidiabetica of middelen ter vermindering van cardiovasculair risico gebruikten en van wie de nierfunctie onbekend was. Van 149 geselecteerde patiënten participeerden 46 (31%) in de studie. Hun nierfunctie werd bepaald door daarvoor getrainde medewerkers. Bij 24 patiënten bleek sprake van een licht tot matig verminderde nierfunctie.

Een apotheker beoordeelde vervolgens de signalen uit het elektronisch medicatiebewakingssysteem. Er waren 9 signalen bij 7 patiënten, waarvan 6 klinisch niet relevant waren. Van de

3 klinisch relevante signalen leidde 1 tot een advies voor aanpassing van de dosering, dat werd overgenomen door de huisarts. De waardering voor deze interventie werd met vragenlijsten geëvalueerd bij patiënten, voorschrijvers en deelnemende apothekers. Over het algemeen waren de reacties positief, onder meer omdat uitslagen direct beschikbaar waren en dus konden meewegen bij de medicatiebewaking. De studie was beperkt van opzet, maar laat zien dat het de moeite waard is de bepaling van labwaarden in de apotheek verder te verkennen.

Geerts AF, de Koning FH, de Vooght KM, Egberts AC, de Smet PA, van Solinge WW. Feasibility of point-of-care creatinine testing in community pharmacy to monitor drug therapy in ambulatory elderly patients. *J Clin Pharm Ther*. 2013 okt;38(5):416-22.

van de Vaart F. Nierfunctie bepaling in de apotheek: veelbelovend. *PW Wetenschappelijk Platform*. 2013;7:e1330.