

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

TEL.: 030 274 2777  
FAX: 030 274 4476  
INFO@COGEM.NET  
WWW.COGEM.NET

**DATUM** 16 juli 2012  
**KENMERK** CGM/120716-02  
**ONDERWERP** Advies: Inschaling werkzaamheden met gg-Rift Valley fever virus

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een verzoek tot wijziging van de vergunning IG 07-150 'Ontwikkeling van een veilig en effectief DIVA vaccin voor *Rift Valley fever virus* (RVFV)' van het Centraal Veterinair Instituut van Wageningen UR, deelt de COGEM u het volgende mee.

#### **Samenvatting**


De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus* (gg-RVFV). Het genoom van het wildtype RVFV bestaat uit drie genoomsegmenten. Het RVFV is ziekteverwekkend voor mens en dier en is geclassificeerd als klasse 3 pathogeen. Ziekte en sterfte onder landbouwhuisdieren is hoog. Besmetting bij dieren vindt voornamelijk plaats via muggen. Humane besmetting wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door contact met bloed, weefsel of organen van geïnfecteerde dieren. Ook inhalatie van aerosolen die vrijkomen tijdens de slacht van geïnfecteerde dieren of tijdens laboratoriumwerkzaamheden heeft geresulteerd in humane infecties.

De aanvrager wil de gg-RVFV virusdeeltjes produceren voor onderzoek naar het mogelijke gebruik van deze deeltjes als vaccin. Doordat deze virusdeeltjes slechts twee van de drie oorspronkelijke genoomsegmenten zullen bevatten, zijn ze niet in staat zich zelfstandig in een cel te vermenigvuldigen. De virusdeeltjes kunnen een cel wel eenmalig infecteren en daarin eiwitten tot expressie brengen. In verband met de mogelijke toepassing als vaccin worden de virusdeeltjes uitgerust met een zogenaamd minigenoom dat codeert voor een deel van een eiwit van het *Influenza A virus* of voor het fluorescerende reporter eiwit eGFP. De aanvrager verzoekt de productie van deze infectieuze niet-spreidende gg-RVFV virusdeeltjes op ML-II inperkingsniveau uit te mogen voeren.

De COGEM vindt het essentieel dat er tijdens de productie van de gg-RVFV virusdeeltjes geen vol-virulent replicerend RVFV kan ontstaan. Onder navolging van enkele aanvullende voorschriften om onbedoelde introductie van onder andere het ontbrekende genoomsegment te voorkomen, acht de COGEM de kans op vol-virulent replicerend RVFV verwaarloosbaar klein en adviseert zij de beschreven werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau in te schalen. Op dit inperkingsniveau en met de aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's bij de productie van beschreven gg-RVFV virusdeeltjes voor mens en milieu 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

*Met het oog op eventuele belangenverstrengelingen zijn de COGEM leden dr. R.J. de Groot, dr. T.G. Kimman en dr. B.P.H. Peeters niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# **Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus***

## **COGEM advies CGM/120716-02**

### **Inleiding**

De COGEM is door het ministerie van Infrastructuur en Milieu gevraagd te adviseren over een verzoek tot wijziging van de vergunning getiteld ‘Ontwikkeling van een veilig en effectief DIVA vaccin voor *Rift Valley fever virus*’ (IG 07-150) van de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, Centraal Veterinair Instituut van het Wageningen UR. De aanvrager verzoekt een deel van de werkzaamheden met het gg-RVfV op ML-II inperkingsniveau uit te mogen voeren. Het betreft de productie van infectieuze niet-spreidende gg-RVfV virusdeeltjes die coderen voor het ectodomein van het neuraminidase of hemagglutinine van het *Influenza virus A* of het eGFP.

### *Rift Valley fever virus*

Het *Rift Valley fever virus* (RVfV) is voor het eerst in 1931 geïdentificeerd bij schapen in de Rift vallei in Kenia. Inmiddels is bekend dat het virus endemisch is in verschillende Afrikaanse landen. In 2000 heeft het virus zich ook in enkele Arabische landen gemanifesteerd. RVfV is primair infectieus voor landbouwhuisdieren (schapen, geiten, koeien en kamelen) wat kan leiden tot grote economische schade. Tevens kan het virus mensen infecteren.<sup>1,2,3</sup>

Bij mensen veroorzaakt het virus doorgaans griepachtige symptomen zoals koorts, hoofdpijn en spierpijn. Een klein deel van de patiënten (1%) ontwikkelt ernstiger verschijnselen zoals oogontsteking, hemorrhagische koorts of hersen- en ruggenmergontsteking.<sup>1,2</sup> Bij dieren zijn in het bijzonder schapen vatbaar voor het virus. Na infectie met het RVfV is de mortaliteit onder volwassen schapen 10%. Bij lammeren overlijdt 90% aan de gevolgen van een RVfV infectie. Als drachtige schapen worden geïnfecteerd is de kans op abortus bijna 100%.<sup>1,2</sup>

Het virus wordt onder dieren voornamelijk verspreid door verschillende muggensoorten.<sup>1,3</sup> In dierexperimenteel onderzoek is aangetoond dat horizontale overdracht van RVfV tussen schapen ook zonder tussenkomst van vectoren mogelijk is. De schapen bleken het virus via hun neus en oren uit te scheiden.<sup>4</sup> Onder mensen vindt besmetting voornamelijk plaats via direct of indirect contact met bloed, weefsels of organen van geïnfecteerde dieren.<sup>1,2,3</sup> Ook inhalatie van aërosolen die vrijkomen tijdens de slacht van geïnfecteerde dieren of tijdens laboratoriumwerkzaamheden heeft geresulteerd in humane infecties.<sup>2</sup> Tevens zijn humane infecties door muggenbeten gerapporteerd.<sup>2,3</sup> Tot op heden is het niet waargenomen dat het virus rechtstreeks van mens tot mens wordt overgedragen.<sup>2,3</sup>

### *Genomische organisatie van RVfV*

RVfV is een enkelstrengs (-) RNA virus dat behoort tot het genus *Phlebovirus* en de familie *Bunyaviridae*. Het genoom bestaat uit drie segmenten: het small (S), medium (M) en large (L) segment.<sup>5</sup> Het S-genoomsegment codeert voor het nucleocapside eiwit N. Dit eiwit vormt samen met de RNA genoomsegmenten het zogenaamde ‘nucleocapside’. Daarnaast codeert het S-

genoomsegment voor het niet-structureel eiwit NSs dat betrokken is bij blokkering van interferon genexpressie. Dit eiwit is niet essentieel voor de levensvatbaarheid van het virus,<sup>6,7</sup> maar speelt een belangrijke rol bij de virulentie van het RVFV.<sup>6,8,9,10,11</sup> Het M-genoomsegment codeert voor de glycoproteïnen Gn en Gc en het niet-structurele eiwit NSm. De glycoproteïnen bevinden zich in het membraan van het virus, waardoor het virus aan doelwitcellen kan binden. Deze interactie faciliteert de opname van het virus in de cel. Het L-genoomsegment codeert voor het virale RNA polymerase L. Dit polymerase is verantwoordelijk voor RNA replicatie en mRNA synthese. De eiwitten L en N zijn essentieel voor RVFV replicatie.

Aan de 5' en 3' uiteinden van de genoomsegmenten van RVFV bevinden zich sequenties die niet coderen voor een eiwit, de zogenaamde 'untranslated regions' of UTRs. Per genoomsegment L, M en S zijn deze UTRs verschillend in lengte en nucleotide volgorde. De UTRs zijn essentieel voor replicatie van de genoomsegmenten en voor het inpakken van de genoomsegmenten in virus partikels.

### **Eerdere vergunningaanvraag en advies**

De COGEM heeft vorig jaar geadviseerd over de werkzaamheden van deze aanvrager met infectieus niet-spreidend gg-RVFV, dat hij wilde onderzoeken voor de ontwikkeling van combinatievaccins. Deze virusdeeltjes bevatten het volledige L- en S-genoomsegment en een zogenaamd minigenoom met een gen van interesse. Het minigenoom was daartoe uitgerust met de UTRs van het S-, M- of L-genoomsegment. De virusdeeltjes missen het volledige M-genoomsegment. Tijdens de productie van deze gg-RVFV deeltjes worden de eiwitten die oorspronkelijk door het M genoomsegment worden gecodeerd *in trans* aangeboden door expressie van een apart expressieplasmide. Het expressieplasmide bevat geen UTRs, waardoor het geproduceerde mRNA niet gerepliceerd en ingepakt wordt in het virusdeeltje en een niet-spreidend virusdeeltje ontstaat.

Voor zijn onderzoek wilde de aanvrager gebruik maken van een minigenoom waarin de coderende sequentie voor het ectodomein van het haemagglutinine (sHA) of van het neuraminidase (sNA) van het *Influenza A virus* H1N1 was gekloneerd. Het door het minigenoom tot expressie gebrachte sHA en sNA bevat geen transmembraananker en wordt in de cel uitgescheiden.

Naast het gebruik van een expressieplasmide met de coderende sequentie van het M-genoomsegment (M-ORF) was de aanvrager ook van plan expressieplasmiden te gebruiken die coderen voor glycoproteïnen niet-gerelateerd aan RVFV. Het betrof glycoproteïnen van het *Influenza A virus* H1N1 (HA of NA), het *Pestes-des-petits-ruminants virus* (PPRV; H of F eiwit), het *Vesicular stomatitis virus* (VSV; G eiwit) en het *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus* (CCHFV; Gn en Gc eiwitten). Deze genen werden *in trans* aangeboden en met behulp van een apart expressieplasmide tot expressie gebracht. Onderstaande tabel geeft een overzicht van de verschillende constructen die de aanvrager wilde gebruiken voor de productie van gg-RVFV virusdeeltjes.

Tabel 1: Transfectie van animale cellen met RVFV genoomsequenties:

Transfectieplasmide	Expressieplasmide	Minigenoom <sup>2</sup>
L- en S-genoomsegment	M-ORF of andere glycoproteïnen <sup>1</sup>	L-, S-, of M-UTRs

<sup>1</sup> van *Influenza A virus*, *Pestes-des-petis-ruminants virus*, *Vesicular stomatitis virus* of CCHFV.

<sup>2</sup> minigenoom bevat reporter gen al dan niet in combinatie met sNA of sHA van *Influenza A virus*

De COGEM heeft geadviseerd bovengenoemde werkzaamheden met gg-RVFV uit te voeren op ML-III inperkingsniveau, aangezien zij niet kon uitsluiten dat tijdens de productie vol-virulent gg-RVFV gevormd zou worden.<sup>12,13</sup> Hier lagen de volgende factoren aan ten grondslag. Ten eerste werd bij gebruik van het minigenoom met de UTRs van het M-genoomsegment alle genomische elementen van het wildtype RVFV in één transfectie samengevoegd. Door een gebrek aan informatie over de in de constructen aanwezige sequenties, was het niet duidelijk of de constructen overlappende sequenties bevatten die homologe recombinatie tussen bijvoorbeeld het minigenoom en het expressieplasmide konden faciliteren. Daarnaast kon de COGEM niet uitsluiten dat door niet-homologe recombinatie autonoom replicerende virusdeeltjes zouden ontstaan. Ook in dit geval was zij van mening dat dit in de ‘worst case’ tot een vol-virulent gg-RVFV kon leiden. Er waren bovendien geen wetenschappelijke gegevens aangeleverd over de mate waarin (non)homologe recombinaties in het beschreven productiesysteem plaatsvinden. Als laatste merkte de COGEM op dat vol-virulent RVFV zou kunnen ontstaan door insleep van het M-genoomsegment.

Eerder dit jaar heeft de COGEM geadviseerd het RVFV in te delen in pathogeniteitsklasse 3.<sup>14</sup>

### De voorgenomen werkzaamheden

In onderhavig wijzigingsverzoek vraagt de aanvrager een deel van bovengenoemde werkzaamheden met gg-RVFV op een lager inperkingsniveau (ML-II) uit te mogen voeren. Het betreft de transfectie van animale cellen met een combinatie van het L- en het S-genoomsegment, een expressieplasmide met de coderende sequentie van de genen die op het M-genoomsegment liggen (M-ORF) en een minigenoom dat het transgen van interesse en de UTRs van het S-genoomsegment bevat. Voor deze studie zal gebruik worden gemaakt van een S-genoomsegment waaruit de coderende sequentie voor het NSs eiwit is verwijderd. Als transgen van interesse zijn het ectodomein van het neuraminidase (sNA4) van *Influenza A virus*, het ectodomein van het hemagglutinine (sHA3) van *Influenza A virus* en het reporter gen voor eGFP aangemerkt. Bij de productie van deze deeltjes wordt geen gebruik gemaakt van plasmiden met de UTRs van het M-genoomsegment. In tabel 2 zijn de verschillende constructen waarop het wijzigingsverzoek betrekking heeft, samengevat.

Tabel 2: Verzoek tot ML-II inschaling van transfectie van animale cellen met de volgende RVFV genoomsequenties:

Transfectieplasmide	Expressieplasmide	Minigenoom <sup>2</sup>
L- en S <sup>1</sup> -genoomsegment	M-ORF	S-UTRs

<sup>1</sup> Het NSs gen is geheel verwijderd

<sup>2</sup> minigenoom bevat het reporter gen eGFP, het sNA4 of het sHA3 van *Influenza A virus*

## Overweging

De aanvrager verzoekt een deel van de handelingen met gg-RVFV die op ML-III zijn vergund op ML-II te mogen uitvoeren. Bij deze werkzaamheden wordt geen gebruik gemaakt van een minigenoom met de UTRs van het M-genoomsegment. Hierdoor zijn bij de productie van betreffende gg-RVFV virusdeeltjes niet alle genomische elementen van het RVFV in een cel aanwezig. Tevens heeft de aanvrager de sequentie overlegd van de constructen die hij wil gebruiken bij de productie van deze gg-RVFV deeltjes. Hieruit blijkt dat de constructen geen overlappende sequenties bevatten die homologe recombinatie tussen de verschillende delen van het RVFV virusgenoom faciliteren. Op basis van deze gegevens acht in deze situatie de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er door homologe recombinatie een replicatiecompetent gg-RVFV ontstaat.

In theorie is het mogelijk dat heterologe recombinatie leidt tot een replicatiecompetent gg-RVFV. Hiervoor moet het M-ORF via een dubbel cross-over event in een (mini)genoomsegment worden geïntroduceerd. Als dit plaatsvindt met een minigenoom met de M-UTRs kan dit leiden tot een vol-virulent replicerend RVFV. Zoals afgeleid kan worden uit een publicatie van Lowen *et al.* is het niet onmogelijk een replicerend Bunyavirus te creëren door een genoomsegment uit te rusten met de UTRs van een ander genoomsegment, maar zal dit resulteren in een verzwakt virus.<sup>15</sup>

In onderhavige situatie zal alleen gebruik worden gemaakt van een minigenoom met de UTRs van het S-genoomsegment. De UTRs van het M-genoomsegment zijn bij voorgenomen productie van gg-RVFV deeltjes niet aanwezig. Bovendien heeft de aanvrager met behulp van kwantitatieve PCR, door analyse van cytopathogeen effect op ‘baby hamster kidney’ cellen en door inoculatie van muizen onderzocht of er replicatiecompetent RVFV ontstaat tijdens de productie van het niet-spreidende gg-RVFV. In geen van deze analyses werd replicatiecompetent RVFV aangetroffen.<sup>16</sup> In de wetenschappelijke literatuur worden deze bevindingen bevestigd voor een vergelijkbaar productiesysteem van gg-RVFV deeltjes.<sup>17</sup> Op basis van deze gegevens is de COGEM van mening dat de kans op het ontstaan van vol-virulent replicatiecompetent RVFV als gevolg van heterologe recombinatie verwaarloosbaar klein is.

Voor de productie van de gg-RVFV deeltjes wordt gebruik gemaakt van het L- en S-genoomsegment. Contaminatie van de experimenten met het volledige M-genoomsegment kan leiden tot het ontstaan van replicatiecompetent RVFV. Om te voorkomen dat de productie gecontamineerd wordt met het volledige M genoomsegment, geeft de aanvrager aan dat het M-genoomsegment niet aanwezig zal zijn op het ML-II laboratorium. De COGEM acht de kans hierdoor verwaarloosbaar klein dat replicatie competent RVFV ontstaat door insleep of andere menselijke fouten.

De aanvrager geeft aan dat voor de werkzaamheden die hij op ML-II inperkingniveau wenst uit te voeren, gebruik gemaakt wordt van een S-genoomsegment waaruit de coderende sequentie voor het NSs eiwit is verwijderd. Zoals blijkt uit de wetenschappelijke literatuur leidt deze

deletie tot attenuatie van het RVFV.<sup>6,8-11</sup> In het theoretische geval dat er tijdens de productie van genoemde gg-RVFV replicatiecompetent gg-RVFV ontstaat, is de COGEM van mening dat door het ontbreken van het NSs eiwit het replicatiecompetente virusdeeltje verzwakt is ten opzichte van het wildtype RVFV.

### Advies

Op basis van bovenstaande overweging adviseert de COGEM de productie van beschreven gg-RVFV virusdeeltjes uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. Gezien het belang van de afwezigheid van het M-genoomsegment of ieder ander plasmide met de UTRs van het M-genoomsegment in voorgenomen experimenten, adviseert zij op dit inperkingsniveau de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- het te gebruiken gastheermateriaal moet vrij zijn van RVFV en andere verwante bunyavirussen,
- het te gebruiken gastheermateriaal moet vrij zijn van UTR sequenties van het M-genoomsegment van RVFV en andere bunyavirussen,
- gedurende de periode dat deze experimenten worden uitgevoerd zijn op het ML-II lab geen plasmiden aanwezig met het volledige M-genoomsegment of met de UTR sequenties van het M-genoomsegment.

Onder navolging van deze voorschriften acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er vol-virulent replicatiecompetent RVFV zal ontstaan. Hierbij is het niet noodzakelijk dat er gebruik wordt gemaakt van een S-genoomsegment, waaruit de coderende sequentie voor het NSs is verwijderd. De COGEM is van mening dat op ML-II inperkingsniveau en onder gestelde voorwaarden het voorkómen van verspreiding van (gg-)RVFV naar het milieu voldoende gewaarborgd is en de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

### Referenties

1. The World Organisation for Animal Health (OIE). Disease Information Summaries Rift Valley fever. <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/disease-information-summaries> (09-07-2012)
2. World Health Organization (WHO). Rift Valley fever virus: Factsheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs207/en/index.html> (09-07-2012)
3. Health Protection Agency (HPA). Rift Valley fever: Topic <http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/RiftValleyFever/> (19-03-2011)
4. Busquets N *et al.* (2010). Experimental infection of young adult European Breed Sheep with *Rift Valley fever virus* field isolates. *Vector-borne and zoonotic diseases* 10(7):689-696
5. Nichol ST *et al.* (2005). Bunyaviridae. In: *Virus taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Edited by Fauquet CM *et al.*, Academic Press 695-716
6. Billecoq A *et al.* (2004). NSs protein of *Rift Valley fever virus* blocks interferon production by inhibiting host gene transcription. *J. Virol.* 78:9798-806
7. Ikegami T *et al.* (2006). Rescue of infectious *Rift Valley fever virus* entirely from cDNA, analysis of virus lacking the NSs gene, and expression of a foreign gene. *J. Virol.* 80(6):2933-40
8. Muller R *et al.* (1995). Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of *Rift Valley fever virus*, which is altered in the small segment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53:405-11

9. Vouloy M *et al.* (2001). Genetic evidence for an Interferon-antagonistic function of *Rift Valley fever virus* nonstructural protein NSs. *J. Virol.* 75:1371-77
10. Teichman von B *et al.* (2011). Safety and efficacy of Rift Valley fever Smithburn and clone 13 vaccines in calves. *Vaccine* 29:5771-77
11. Dingu B *et al.* (2010) Evaluation of the efficacy and safety of the Rift Valley fever clone 13 vaccine in sheep. *Vaccine* 28: 4581-7
12. COGEM (2011). Advies: inschaling productie genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus*. CGM/110322-01
13. COGEM (2011). Aanvullend advies: Inschaling van *in vitro* werkzaamheden met gg-*Rift Valley fever virus* en gg-*Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*. CGM/110428-05
14. COGEM (2012). Classificaties van humaan- en dierpathogene virussen. CGM/120301-01
15. Lowen AC *et al.* (2005). Attenuation of Bunyavirus replication by rearrangement of viral coding and noncoding sequences. *J. Virol.* 79:6940-6
16. Kortekaas J *et al.* (2011). Creation of a nonspreading Rift Valley fever virus. *J. Virol.* 85:12622-30
17. Dodd KA *et al.* (2012). Single-dose immunization with virus replicon particles confers rapid robust protection against Rift Valley fever virus challenge. *J. Virol.* 86:4204-12