

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw W.J. Mansveld  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 15 juli 2015  
**KENMERK** CGM/150715-01  
**ONDERWERP** Advies inschaling van werkzaamheden met replicons afgeleid van het  
*Venezuelan equine encephalitis virus*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag met de titel: '*Generation of IPS cells by a synthetic Self-Replicative RNA*' van het Academisch Ziekenhuis Leiden, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met zogenoemde replicons die gebaseerd zijn op het *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV). De aanvrager wil deze replicons gebruiken voor zijn onderzoek naar de ontwikkeling van pluripotente stamcellen. De aanvrager verzoekt de *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden op respectievelijk ML-I en D-I niveau te mogen uitvoeren.

Het VEEV is ziekteverwekkend voor paarden en kan ook bij de mens ziekte veroorzaken. Het virus komt voor in de tropische en subtropische regio's van Centraal-, Noord- en Zuid-Amerika en wordt hoofdzakelijk door muggen verspreid. Het virus en de benodigde muggensoorten komen tot op heden niet voor in Nederland.

Uit het genoom van de VEEV replicons zijn enkele essentiële genen verwijderd. Hierdoor worden er geen nieuwe virusdeeltjes gevormd en kunnen de replicons zich niet verder verspreiden. Op basis van deze eigenschappen is de COGEM van mening dat de replicons biologisch ingeperkt zijn. De COGEM adviseert daarom de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden in te schalen op ML-I inperkingsniveau en de *in vivo* werkzaamheden op D-I inperkingsniveau. Op deze inperkingsniveau's en onder navoring van de voorschriften die op deze niveaus gelden, is COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.



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

*Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM lid prof. dr. R.C. Hoeben niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# **Inschaling van werkzaamheden met replicons afgeleid van het *Venezuelan equine encephalitis virus***

## **COGEM advies CGM/150715-01**

### **Inleiding**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met RNA replicons die zijn afgeleid van het *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV). De aanvrager wil de replicons gebruiken voor transfectie van animale cellen om geïnduceerde pluripotente stamcellen te vervaardigen. De aanvrager verzoekt om de transfectie van animale cellen en de handelingen met deze cellen op ML-I te mogen uitvoeren. Daarnaast wil de aanvrager de replicons en de getransfecteerde cellen in muizen toepassen op D-I niveau.

### ***Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV)**

Het VEEV behoort tot het genus *Alphavirus* binnen de familie *Togaviridae*.<sup>1</sup> Het virus werd in 1938 voor het eerst geïsoleerd uit de hersenen van zieke paarden in de deelstaat Yaracuy in Venezuela (Zuid Amerika). Later werd het virus ook aangetroffen in de tropische en subtropische regio's van Noord- en Centraal Amerika.<sup>2</sup>

Het VEEV is onderdeel van het zogenoemde VEE complex. Dit complex bestaat uit zeven verschillende virussoorten en veertien verschillende subtypen.<sup>2</sup> Het VEEV behoort tot subtype I en wordt op basis van serologie verder onderverdeeld in epizoötische (IAB en IC) en enzoötische stammen (ID, IE en IF).<sup>3</sup> De epizoötische stammen zijn zeer pathogeen voor paarden. Ook kunnen deze stammen ziekte veroorzaken bij mensen. Bij volwassenen leidt een infectie doorgaans tot ziekteverschijnselen als koorts, hoofdpijn, spierpijn en keelontsteking. In jonge kinderen kan een infectie leiden tot hersenontsteking (encefalitis).<sup>3</sup> De incidentie van encefalitis is minder dan vijf procent en de mortaliteit minder dan 1 procent.<sup>1</sup> Kinderen die herstellen van encefalitis kunnen hier neurologische stoornissen aan overhouden. Bij zwangere vrouwen kan een infectie leiden tot foetale afwijkingen en miskramen.<sup>3</sup>

Het VEEV wordt hoofdzakelijk door de muggensoorten *Culex melanoconion* spp. verspreid.<sup>1</sup> Daarnaast zijn er gevallen beschreven waarbij onder laboratoriumomstandigheden aërogene verspreiding heeft plaatsgevonden.<sup>4</sup> Het is onduidelijk in hoeverre aërogene verspreiding onder natuurlijke omstandigheden een rol speelt.

Er is op dit moment één levend verzwakt VEEV vaccin beschikbaar voor gebruik bij paarden. Dit vaccin, genaamd TC-83, is geproduceerd door de virulente IAB stam *Trinidad donkey* 83 keer te passeren in hartcellen van cavia's. TC-83 wordt nog geproduceerd in Mexico en Colombia, maar is in de Verenigde Staten alleen beschikbaar in geïnactiveerde vorm.<sup>4</sup> Het wild-type VEEV is in de Regeling GGO ingedeeld als een virus van pathogeniteitsklasse 3.

### **Genomische organisatie van VEEV**

Het VEEV heeft een positief, enkelstrengs RNA genoom van ongeveer 11,4 kilobasen.<sup>4</sup> Het genoom codeert voor zeven eiwitten, waarvan vier niet-structurele en drie structurele eiwitten. De niet-structurele eiwitten (nsP1 – nsP4) worden gecodeerd door genen aan het 5'-uiteinde. Op het 3'-uiteinde liggen de genen die coderen voor de structurele eiwitten.<sup>5</sup> Daarnaast bezit het genoom een zogenaamd *packaging signaal* dat noodzakelijk is om het genomisch RNA in te pakken in een eiwitmantel. De eiwitmantel wordt gevormd door het capsid-eiwit (C) en wordt op zijn beurt omgeven door een lipidemembraan. Dit membraan bevat twee glycoproteïnes (E1 en E2), die betrokken zijn bij de aanhechting en infectie van de gastheer cel. De glycoproteïnes zijn daarmee direct van invloed op het gastheerbereik.<sup>5</sup>

Tijdens de replicatie van het VEEV dient het genomische RNA als messenger RNA voor de niet-structurele eiwitten en als mal voor de synthese van een complementaire negatieve RNA streng. Deze negatieve RNA streng fungeert op zijn beurt als mal voor de synthese van nieuw genomisch RNA. Daarnaast wordt op basis van deze negatieve RNA streng ook messenger RNA gevormd voor de productie van de structurele eiwitten.<sup>5</sup>

### **VEE gebaseerde replicon deeltjes**

Het genoom van de VEEV RNA replicons in onderhavige aanvraag bevat alleen genen die coderen voor de vier niet-structurele eiwitten van VEEV en voor de humane transcriptiefactoren *Oct4*, *Klf4*, *Sox2* en *Glis1*. Verder bevatten de replicons twee *internal ribosome entry site sequences* (IRES) en een puromycine resistentiegen (Puro<sup>r</sup>). Alle genen die coderen voor de structurele eiwitten van VEEV zijn afwezig. Ook is er geen *packaging signaal* aanwezig.<sup>6</sup> De RNA replicons worden volgens de aanvrager vervaardigd door *in vitro* transcriptie vanaf een DNA template.

De aanvrager wil de VEEV RNA replicons gebruiken voor het genereren van geïnduceerde pluripotente stamcellen. De aanvrager wil transfectie-experimenten met deze replicons uitvoeren op ML-I niveau. Daarnaast wil hij *in vivo* experimenten in muizen uitvoeren op D-I niveau.

### **Eerdere COGEM adviezen**

De COGEM heeft in 2009 geadviseerd over werkzaamheden met op VEEV gebaseerde replicondeeltjes. Het betrof hierbij zogenoemde null-replicon deeltjes (null-VRP's) die alleen de genen bevatten die coderen voor de niet-structurele eiwitten van het VEE virus. Er was verder ook geen transgen aanwezig.<sup>7</sup> Tijdens de productie van de null-VRP's werden de genen die coderen voor de structurele eiwitten *in trans* aangeboden door middel van twee helper RNA's. Hierdoor werden de replicons ingepakt in virusdeeltjes.

De onderzoekers wilden onderzoeken of zij met behulp van de null-VRP's de immunreactie tegen het poliovaccin konden versterken. De COGEM was destijds van mening dat de veiligheid voor mens en milieu gewaarborgd blijft als de voorgenomen *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden op respectievelijk ML-II en DM-II niveau uitgevoerd werden. Omdat de COGEM niet uit kon sluiten dat de laboratoriummedewerker tijdens de werkzaamheden op DM-II niveau via aëroge verspreiding blootgesteld kon worden aan de VRP's en eventueel aanwezige replicatiecompetente virussen, adviseerde zij enkele additionele maatregelen in acht te nemen.<sup>7</sup>

## **Overweging**

De aanvrager wil in onderhavige aanvraag gebruik maken van VEEV RNA replicons. Tijdens de productie van deze replicons worden er geen structurele eiwitten *in trans* aangeboden. Hierdoor worden de replicons niet ingepakt in virusdeeltjes. Met deze niet-infectieuze, zelfreplicerende RNA replicons wil de aanvrager animale cellen transfecteren. Daarnaast wil hij deze replicons en getransfecteerde cellen toepassen in muizen.

### *Recombinatie/complimentatie*

Een eventueel risico tijdens de voorgenomen werkzaamheden betreft het optreden van recombinatie of complementatie indien er wild-type VEEV in de cellijn of het proefdier aanwezig is. Het VEEV en verwante virussen uit het zogenaamde VEE-complex komen niet in Europa voor. Ook komen de muggensoorten (*Culex melanoconion* spp.) die het virus verspreiden hier niet voor. De COGEM acht het onwaarschijnlijk dat de gebruikte cellijnen en proefdieren geïnfecteerd zijn met wild-type VEEV of verwante virussen. Zij is daarom van mening dat de kans op recombinatie en complementatie verwaarloosbaar klein is.

### *Persistentie*

Getransfecteerde cellen induceren een interferon alfa/bèta (INF  $\alpha/\beta$ ) immuunrespons tegen de VEEV RNA replicons.<sup>6</sup> Om deze respons te beperken voegt de aanvrager het zogenoemde B18R eiwit toe aan het kweekmedium. Dit eiwit, afkomstig van het Western Reserve vaccinia virus, bindt en neutraliseert het INF  $\alpha/\beta$  waardoor de replicons in de getransduceerde cellen persisteren. Na ongeveer 3 weken wordt er geen B18R eiwit meer aan het medium toegediend. Dit resulteert volgens de aanvrager in de volledige degradatie van het VEEV RNA in de getransfecteerde cellen.

In de literatuur is beschreven dat de replicons door middel van adaptieve mutaties minder gevoelig kunnen worden voor de IFN respons en daardoor langer in de cellen aanwezig kunnen zijn.<sup>8</sup> Dergelijke mutanten kunnen zich in afwezigheid van B18R nog vermeerderen. Aangezien de replicons geen coderende sequenties voor structurele eiwitten bevatten en er geen *packaging signaal* aanwezig is, zullen de replicons niet ingepakt worden in virusdeeltjes. Ook brengen de replicons geen schadelijke eiwitten tot expressie. De COGEM acht de risico's van de langdurigere aanwezigheid van de replicons daarom verwaarloosbaar klein.

### *Verspreiding via exosomen*

Nadat het replicon RNA via transfectie in de cellen is gebracht, zal het zich vermeerderen. Het is niet uitgesloten dat het replicon RNA zich via exosomen in de kweek kan verspreiden. Dit kan ertoe leiden dat het aantal cellen met een replicon in de celkweek toeneemt. Een dergelijke wijze van verspreiding is eerder voor RNA virussen beschreven.<sup>9</sup> Met het oog op het apathogene karakter van de replicons acht de COGEM de risico's van deze wijze van verspreiding verwaarloosbaar klein.

## **Advies**

Op basis van bovenstaande overwegingen is de COGEM van mening dat de VEEV RNA replicons biologisch ingeperkt zijn. De genen die coderen voor de structurele eiwitten van VEEV zijn afwezig

en het replicon bevat geen *packaging signaal*. Hierdoor kunnen er geen virusdeeltjes worden gevormd. De COGEM adviseert daarom de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden in te schalen op ML-I inperkingsniveau en de *in vivo* werkzaamheden op D-I inperkingsniveau. Op deze inperkingsniveau's en onder navolging van de voorschriften die op deze niveaus gelden, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: Fields virology, volume one, sixth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
2. Weaver SC *et al.* (2004). Venezuelan Equine Encephalitis. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 141-174
3. Griffin DE (2008). Togaviruses: Equine Encephalitic Viruses. In: *Encyclopedia of Virology*, third edition. Ed. Mahy BWJ & Van Regenmortel MHV, Elsevier Ltd.
4. Paessler S & Weaver SC (2009). Vaccines for Venezuelan equine encephalitis. *Vaccine* 27: D80–D85
5. Powers A *et al.* (2012). Family *Togaviridae*. In *Virus taxonomy*, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
6. Yoshioka N *et al.* (2013). Efficient Generation of Human iPSCs by a Synthetic Self-Replicative RNA. *Cell Stem Cell.* 13: 246-254
7. COGEM (2009). Inschaling van werkzaamheden met op het VEE virus gebaseerde replicondeeltjes. COGEM advies CGM/090603-01
8. Petrakova O *et al.* (2005). Noncytopathic replication of Venezuelan equine encephalitis virus and eastern equine encephalitis virus replicons in Mammalian cells. *J Virol.* 79(12):7597-7608
9. Chahar HS *et al.* (2015). Exosomes and Their Role in the Life Cycle and Pathogenesis of RNA Viruses. *19: 3204-3225*