

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw S.A.M. Dijkma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 02 mei 2016
KENMERK CGM/160502-04
ONDERWERP Advies omlaagschaling van werkzaamheden met gepseudotypeerd, single-round genetisch gemodificeerd *Vesicular stomatitis Indiana virus*

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van vergunningaanvraag IG-15-406_2.8-000 getiteld: '*In vitro neutralisatie assay met behulp van pseudotyped rVSV*' van Crucell Holland B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Vesicular stomatitis Indiana virus* (gg-VSIV). Het gg-VSIV in deze aanvraag mist het eigen zogenoemde G-eiwit, waardoor het virus geen cellen kan infecteren. Aan de virusdeeltjes worden de G-eiwitten van het Ebolavirus of Marburgvirus toegevoegd, zonder dat de coderende sequentie van deze eiwitten in het virale genoom worden ingebouwd. Hierdoor kunnen de virusdeeltjes maar één keer een cel infecteren (*single round*). De aanvrager verzoekt de werkzaamheden op ML-II niveau te mogen uitvoeren.

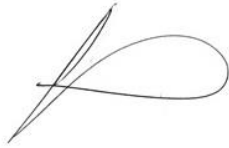
De COGEM is van mening dat het geproduceerde gg-virus met de G-eiwitten van het Ebolavirus of Marburgvirus verzwakt zijn in mens en dier. Er is een theoretisch risico dat de coderende sequentie van het G-eiwit van VSIV, het Ebolavirus of het Marburgvirus tijdens de productie van de virusdeeltjes door recombinatie in het virale genoom van het gg-VSIV wordt ingebouwd. Maar gezien de wijze van productie acht de COGEM de kans op recombinatie verwaarloosbaar klein.

Op basis van de aangeleverde gegevens adviseert de COGEM de voorgenomen werkzaamheden met het *single-round* gg-VSIV in te schalen op ML-II niveau. Op genoemd inperkingsniveau acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden 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. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Omlaagschaling van werkzaamheden met gepseudotypeerd, ‘single-round’ genetisch gemodificeerd *Vesicular stomatitis Indiana virus*

COGEM advies CGM/160502-04

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Vesicular stomatitis Indiana virus* (gg-VSIV). De werkzaamheden omvatten de productie van gg-VSIV dat gepseudotypeerd is met het glycoproteïne van het Ebolavirus of het Marburgvirus. De aanvrager wil de gepseudotypeerde gg-virussen gebruiken voor het opzetten van een assay waarmee neutraliserende eiwitten in het serum van proefdieren gemeten kunnen worden. De aanvrager verzoekt de experimenten op ML-II inperkingsniveau te mogen uitvoeren.

Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV)

Het VSIV behoort tot het genus *Vesiculovirus* binnen de familie van de *Rhabdoviridae*. Het genus *Vesiculovirus* omvat 9 verschillende virussoorten.¹ Vesiculovirussen infecteren vooral zoogdieren en vissen. In endemische gebieden infecteren zij ook vogels en reptielen. De virussen worden overgedragen door insecten, via direct contact of via inhalatie van virus bevattende aerosolen.²

VSIV is enzoötisch in Mexico, Centraal Amerika, het noordelijk deel van Zuid-Amerika en Oost-Brazilië. Het virus veroorzaakt de ziekte ‘vesicular stomatitis’ in vee, waaronder koeien, paarden en varkens.³ Deze ziekte wordt gekarakteriseerd door blaasjes op de tong, het tandvlees, de uiers en de hoeven van de dieren en lijkt daarmee sterk op mond- en klauwzeer.⁴ Hoewel de mortaliteit in dieren zeer laag is, bestaat er nog geen specifieke behandeling tegen de ziekte.⁴ De meeste dieren die geïnfecteerd raken met VSIV herstellen binnen twee weken.⁴ Een uitbraak van VSIV kan grote economische schade tot gevolg hebben.

VSIV kan ook mensen infecteren. Infectie vindt vaak plaats via blootstelling aan geïnfecteerde dieren. Ook is infectie door blootstelling aan het virus in het laboratorium beschreven.^{2,3} De meeste humane infecties verlopen zonder klinische verschijnselen. Mensen die wel ziek worden, ontwikkelen in eerste instantie hoge koorts gevolgd door griepachtige symptomen, waaronder hoofdpijn, misselijkheid, spierpijn en gewrichtspijn. De ziekte duurt doorgaans drie tot zes dagen en wordt niet geassocieerd met sterfte.³ Verspreiding tussen mensen onderling is tot op heden niet in de literatuur gerapporteerd.⁵ Er is nog geen specifieke behandeling van patiënten voorhanden. De behandeling bestaat voornamelijk uit symptoombestrijding.

Het VSIV genoom

Het VSIV heeft een negatief enkelstrengs RNA genoom. Het genoom codeert voor vijf structurele eiwitten: het zogenaamde nucleoproteïne (N-eiwit), het phosphoproteïne (P-eiwit), het matrixproteïne (M-eiwit), het glycoproteïne (G-eiwit) en het RNA polymerase (L-eiwit).² Het genoom wordt ingepakt in een kogelvormig virusdeeltje. De N, L en P eiwitten vormen een RNA-

afhankelijk RNA-polymerase complex dat verantwoordelijk is voor zowel virale transcriptie als replicatie.³ Het G-eiwit vormt samen met het gastheermembraan de envelop van het virus. Dit eiwit is verantwoordelijk voor de verankering aan en fusie met de gastheercel.² Het M-eiwit heeft een belangrijke rol in de constructie van het virus, virus ‘budding’ en de apoptose van de cel.³

Filoviridae

Het Ebolavirus en het Marburgvirus behoren tot de familie van de *Filoviridae*. Deze negatief enkelstrengs RNA virussen zijn endemisch in Centraal-Afrika en veroorzaken een zeer ernstige vorm van hemorragische koorts in mensen en niet-menselijke primaten die in bijna negentig procent van de gevallen een dodelijke afloop kent.¹

De ziekte presenteert zich over het algemeen acuut waarbij symptomen als algehele malaise, koorts, hoofdpijn en myalgie optreedt. Daarnaast worden regelmatig andere symptomen zoals keelpijn, misselijkheid, braken, buikpijn, diarree, pijn op de borst en hoesten waargenomen. Rond de vijfde ziektedag kunnen er puntvormige huidbloedingen, bloeduitstortingen onder de huid en mucosale bloedingen optreden. Sterfte treedt doorgaans op in de tweede week na besmetting.⁶ De meest recente ebola-epidemie, die in december 2013 in West-Afrika begon, heeft al aan meer dan 11.000 mensen wereldwijd het leven gekost.^{7,8} Inmiddels lijkt de epidemie ten einde.⁷

Mede vanwege de hoge virulentie en de afwezigheid van effectieve therapie zijn het Ebolavirus en het Marburgvirus ingedeeld in pathogeniteitsklasse 4.⁹

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft in 2012 geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met replicatiecompetente VSIV deeltjes, waarin het gen dat codeert voor de virale glycoproteïne is vervangen door een sequentie die codeert voor het glycoproteïne van het Ebolavirus of het Marburgvirus.¹⁰ De COGEM was destijds van mening dat de aangeleverde literatuurgegevens niet overtuigend bewezen dat de gg-virussen voldoende geattenuëerd waren ten opzichte van het wild-type VSIV. Conform de classificatie van het VSIV in pathogeniteitsklasse 3 adviseerde de COGEM de werkzaamheden op ML-III inperkingsniveau uit te voeren.¹⁰

In maart 2016 heeft de COGEM advies uitgebracht over de omlaagschaling van werkzaamheden met gg-VSIV dat de coderende sequentie van het glycoproteïne van het Ebolavirus bevat (gg-VSIV-ZEBOV). Op basis van resultaten uit nieuwe studies concludeerde de COGEM dat het gg-VSIV-ZEBOV geattenuëerd is ten opzichte van het wild-type VSIV in mensen en niet-humane primaten en dat het hoogst waarschijnlijk geattenuëerd is in landbouwhuisdieren. De COGEM adviseerde om de voorgenomen laboratoriumwerkzaamheden, onder navolging van enkele aanvullende werkvoorschriften, van ML-III naar ML-II niveau omlaag te schalen.¹¹

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil gg-VSIV produceren dat gepseudotypeerd is met het glycoproteïne van het Ebolavirus of het Marburgvirus. Hiervoor maakt de aanvrager gebruik van een commercieel product afkomstig van het bedrijf Kerafast uit de Verenigde Staten. Kerafast heeft via *reverse genetics* gg-VSIV geproduceerd dat gepseudotypeerd is met zijn eigen G-eiwit. Een korte beschrijving van dit systeem volgt hieronder.

Productie van gepseudotypeerd gg-VSIV

De eerste stap bestaat uit co-transfectie van het zogenoemde Δ G-VSIV plasmide met helper plasmiden die de N, P- en L-eiwitten van VSIV tot expressie brengen alsmede een plasmide dat het G-eiwit tot expressie brengt. Het Δ G-VSIV plasmide staat onder de controle van een T7 promotor, waardoor het Δ G-VSIV genomisch RNA wordt afgeschreven wanneer ook T7 RNA polymerase aanwezig is. Dit T7 RNA polymerase wordt tot expressie gebracht m.b.v. een vaccinia virus. Het Δ G-VSIV plasmide mist het gen dat codeert voor het VSIV G-eiwit. Deze sequentie is vervangen door de sequentie van het luciferase reporter gen. Na de co-transfectie en infectie met vaccinia-T7 wordt het geproduceerde virus gezuiverd en in cellen gebracht die getransfecteerd zijn met het pCAGGS-G-Kan plasmide. Dit plasmide brengt het ontbrekende G-eiwit van VSIV wederom tot expressie. Deze procedure levert gg-virus op dat gepseudotypeerd is met het G-eiwit van VSIV, maar de sequentie van het G-eiwit zelf niet bevat. Dit gepseudotypeerde gg-virus wordt G* Δ G-VSIV genoemd. Door afwezigheid van de sequentie van het G-eiwit is het virus replicatie-incompetent en slecht één ronde infectieus (*single-round*). De aanvrager gaat met een batch van dit virus werken. Kerafast heeft een plaquezuivering uitgevoerd om het vacciniavirus kwijt te raken.

Multiplicatiestap

De aanvrager begint met een multiplicatiestap. Tijdens deze stap worden HEK293T cellen eerst getransfecteerd met het pCAGGS-G-Kan plasmide. Vervolgens worden de getransfecteerde cellen geïnfecteerd met G* Δ G-VSIV. Hierbij worden nieuwe G* Δ G-VSIV deeltjes geproduceerd.

Pseudotypering met Ebola en Marburg glycoproteïnen

De tweede stap van het proces is vrijwel identiek aan de hierboven beschreven multiplicatiestap. Echter, in plaats van transfectie met pCAGGS-G-Kan, worden de cellen getransfecteerd met plasmiden die het glycoproteïne van het Ebolavirus (stam Kikwit, Mayinga of Sudan Gulu) of het Marburgvirus (stam Angola) tot expressie brengen. Hieruit ontstaat *single-round* gg-VSIV dat gepseudotypeerd is met het G-eiwit van respectievelijk Ebolavirus of Marburgvirus.

De gepseudotypeerde virussen worden gebruikt voor het opzetten van een assay waarmee neutraliserende eiwitten tegen het Ebolavirus of het Marburgvirus in sera van proefdieren gemeten kunnen worden.

Overweging

De aanvrager wil werkzaamheden uitvoeren met gg-VSIV dat gepseudotypeerd is met het glycoproteïne van het Ebolavirus of het Marburgvirus. In 2016 heeft de COGEM geadviseerd over de omlaagschaling van werkzaamheden met replicatie-competent gg-VSIV dat de coderende sequentie van het glycoproteïne van het Ebolavirus bevat (gg-VSIV-ZEBOV).¹¹ De COGEM concludeerde destijds dat replicatie-competent gg-VSIV-ZEBOV geattenuëerd is in mensen en niet-humane primaten. Ook achtte zij het aannemelijk dat gg-VSIV-ZEBOV geattenuëerd is in landbouwhuisdieren. De COGEM achtte het daarom gerechtvaardigd om de werkzaamheden met gg-VSIV-ZEBOV van ML-III naar ML-II niveau omlaag te schalen onder navolging van enkele aanvullende werkvoorschriften.

Ten opzichte van het gg-VSIV-ZEBOV is het gg-virus dat de aanvrager wil gebruiken nog verder biologisch ingeperkt, omdat de coderende sequentie voor het glycoproteïne van het Ebolavirus of het Marburgvirus niet in het virale genoom aanwezig is. Deze glycoproteïnen worden door aparte plasmiden tot expressie gebracht. Het gepseudotypeerde gg-VSIV dat tijdens de werkzaamheden wordt geproduceerd, is replicatie-incompetent en slechts één ronde infectieus. Op basis van deze gegevens is de COGEM van mening dat de gepseudotypeerde gg-virussen geattenuëerd zijn in mens en dier.

Recombinatie

Het gepseudotypeerde uitgangsvirus genaamd G*ΔG-VSIV is geproduceerd via *reverse genetics*. Er is een theoretisch risico dat er tijdens de eerste *reverse genetics* stap recombinatie optreedt tussen het plasmide dat het virale genoom van ΔG-VSIV bevat en de coderende sequentie van het VSIV G-eiwit in het pCAGGS-G-Kan plasmide. Hieruit zou een replicatie-competent VSIV deeltje kunnen ontstaan. De aanvrager geeft echter aan dat er geen overeenkomende sequenties zijn tussen het virale genoom van ΔG-VSIV en het pCAGGS-G-Kan plasmide waardoor eventuele homologe recombinatie niet kan optreden. Bovendien zou replicatie-competent ΔG-VSIV waarin het G-eiwit weer is opgenomen, opgemerkt moeten worden in de plaquezuiveringen van G*ΔG-VSIV. De COGEM merkt op dat recombinatie tussen viraal RNA (ΔG-VSIV) en DNA (plasmide pCAGGS-G-Kan) tijdens de volgende amplificatiestappen niet zal plaatsvinden.

Recombinatie tussen mRNA en viraal RNA is zeer onwaarschijnlijk doordat het virale RNA wordt ingepakt in een ribonucleïnecomplex. De *Rhabdoviridae* staan door deze eigenschap nauwelijks bekend om het ontstaan van recombinanten. Op basis van deze gegevens acht de COGEM de kans op recombinatie en het ontstaan van replicatie-competent gg-VSIV verwaarloosbaar klein.

In theorie kan er ook recombinatie optreden tussen het virale genoom van G*ΔG-VSIV en de plasmiden die de sequentie voor het G-eiwit van het Ebolavirus of het Marburgvirus bevatten. De bovengenoemde argumenten met betrekking tot de kans op recombinatie zijn ook op deze situatie van toepassing. Daarom acht de COGEM ook in dit geval de kans op recombinatie verwaarloosbaar klein. Daarbij merkt zij op dat recombinatie in het ergste geval tot een replicatie-

competent gg-virus zal leiden met eigenschappen vergelijkbaar aan gg-VSIV-ZEBOV. De COGEM heeft eerder geconcludeerd dat dergelijke virussen geattenuëerd zijn in mensen en humane primaten. Het Marburgvirus behoort tot dezelfde virusfamilie als het Ebolavirus. Beide virussen veroorzaken dezelfde ziekteverschijnselen en maken voor infectie gebruik van dezelfde receptor (TIM-1).¹² Op basis van de vergelijkbare eigenschappen verwacht de COGEM dat replicatie-competent gg-VSIV gepseudotypeerd met het glycoproteïne van het Marburgvirus op dezelfde wijze geattenuëerd zal zijn als gg-VSIV-ZEBOV.

Advies

Op basis van de aangeleverde gegevens adviseert de COGEM de voorgenomen werkzaamheden met gespseudotypeerd, *single-round* gg-VSIV in te schalen op ML-II niveau. Op genoemd inperkingsniveau acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. King AMQ *et al.* (editors) (2012). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Elsevier Academic Press
2. Rose JK & Whitt MA (2001). *Rhabdoviridae: the viruses and their replication*. In Fields Virology. Ed. Knipe MD and Howley PM. Philadelphia:
3. Lichy BD *et al.* (2004). Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. Trends. Mol. Med. 10: 210-216.
4. Letchworth GJ *et al.* (1999). Vesicular stomatitis. Vet. J. 157: 239-60
5. Public Health Agency of Canada (PHAC). www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/stomatit-eng.php (1 maart 2016)
6. LCI-richtlijn Virale hemorrhagische koorts: Filovirussen. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. <http://bit.ly/HWPDjX> (bezoekt 1 maart 2016)
7. Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu. Ebola-uitbraak West-Afrika 2014/2015 <http://bit.ly/1WBO2tZ> (bezoekt 1 maart 2016)
8. World Health Organization. Situation Report. www.who.int/csr/disease/ebola/en/ (bezoekt 1 maart 2016)
9. COGEM (2012). Classificaties van humaan- en dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/120301-01
10. COGEM (2012). Inschaling van onderzoek naar Ebolavirus en Marburgvirus infecties met genetisch gemodificeerd VSIV. COGEM advies CGM/120417-02
11. COGEM (2016). Omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Vesicular stomatitis Indiana virus*. COGEM advies CGM/160310-01
12. Kondratowicz *et al.* (2011). T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. PNAS 108: 8426-8431