

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

**DATUM** 15 augustus 2016  
**KENMERK** CGM/160815-01  
**ONDERWERP** Advies inschaling van werkzaamheden met gg-replicondeeltjes afgeleid van  
*Venezuelan equine encephalitis virus*

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van vergunningaanvraag IG 16-193\_2.8-000 getiteld: 'Omlaagschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met alphavirus RNA deeltjes' van Intervet International B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met zogenoemde replicons die gebaseerd zijn op het *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV). De aanvrager wil deze replicons testen in varkens als vaccinatie tegen *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV). De aanvrager verzoekt de werkzaamheden op ML-II en D-I uit te mogen voeren.

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 verspreid door muggen. Het virus en de benodigde muggensoorten komen tot op heden niet voor in Nederland.

PEDV veroorzaakt een darminfectie in varkens die gepaard gaat met diarree en een vermindering van de groei. Een infectie kan bij jonge biggen zorgen voor een hoge mortaliteit. Het virus wordt verspreid via besmette mest.

Uit het genoom van het VEEV replicon zijn de structurele genen verwijderd. Hierdoor kunnen er geen nieuwe virusdeeltjes gevormd worden en kunnen de replicons zich niet verder verspreiden. Daarnaast zijn het gen dat codeert voor het S eiwit van PEDV en enkele additionele mutaties in het replicon RNA geïntroduceerd.

Op basis van deze eigenschappen adviseert de COGEM de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden in te schalen op ML-II inperkingsniveau en de *in vivo* werkzaamheden op DM-II inperkingsniveau. Op deze inperkingsniveaus en onder navolging van enkele aanvullende voorschriften, 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 belangenverstremeling is het COGEM lid Dr. T. Boekhout niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# Inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met replicons afgeleid van *Venezuelan equine encephalitis virus*

## COGEM advies CGM/160815-01

### 1. Inleiding

Naar aanleiding van vergunningaanvraag IG 16-193\_2.8-000 getiteld: 'Omlaagschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met alphavirus RNA deeltjes' van Intervet International B.V. is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van de voorgenomen werkzaamheden. De aanvrager wil genetisch gemodificeerde (gg-)virusdeeltjes produceren die afgeleid zijn van het *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) en waarin een eiwit uit *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV) geïntroduceerd is. Deze gg-replicondeeltjes zullen vervolgens gebruikt worden om varkens te vaccineren tegen PEDV. De aanvrager verzoekt om de transfectie van de animale cellen en de handelingen met deze cellen op ML-II en de vaccinatie van varkens op D-I inperkingsniveau uit te mogen uitvoeren.

### 2. *Venezuelan equine encephalitis virus*

VEEV behoort binnen de familie *Togaviridae* tot het genus *Alphavirus*.<sup>1,2</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>3</sup>

VEEV kan een milde tot ernstige ziekte veroorzaken in paarden. De ziekteverschijnselen variëren van koorts tot ernstige encefalitis. VEEV kan ook een ziekte veroorzaken bij de mens. 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>4,5</sup> De incidentie van encefalitis is minder dan vijf procent en de mortaliteit minder dan één 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>4</sup>

VEEV wordt hoofdzakelijk door de muggensoorten *Culex melanoconion* spp. verspreid.<sup>1</sup> Daarnaast zijn er gevallen beschreven waarbij onder laboratoriumomstandigheden aerogene verspreiding heeft plaatsgevonden.<sup>6</sup> Het is onduidelijk in hoeverre aerogene 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 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>6</sup> Het wild-type VEEV is in de Regeling GGO ingedeeld als een virus van pathogeniteitsklasse 3. Volgens het Centers of Disease Control kunnen werkzaamheden met de vaccinstam TC-83 uitgevoerd worden op bsl-2.<sup>7</sup>

### ***Genomische organisatie van VEEV***

Het VEEV heeft een positief, enkelstrengs RNA genoom van ongeveer 11,4 kilobasen.<sup>2,6</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 in de 5' regio. In de 3' regio liggen de genen die coderen voor de structurele eiwitten (C, E1 en E2). Daarnaast bezit het genoom een zogenaamd packagingsignaal dat noodzakelijk is om het genomisch RNA (gRNA) in te pakken in een eiwitmantel. De eiwitmantel wordt gevormd door het capsid-eiwit (C) en wordt op zijn beurt omgeven door een lipidenmembraan. Dit membraan bevat twee glycoproteïnes (E1 en E2), die betrokken zijn bij de aanhechting en infectie van de gastheercel. De glycoproteïnes zijn daarmee direct van invloed op het gastheerbereik.<sup>2</sup>

### ***3. Porcine epidemic diarrhea virus***

PEDV behoort binnen de familie *Coronaviridae* tot het genus *Alphacoronavirus*.<sup>8</sup> In 1972 is de ziekte die door PEDV veroorzaakt wordt in Groot-Brittannië voor het eerst beschreven. In de jaren daarna verspreidde het virus naar meerdere varkens-producerende landen in Europa. In 1982 is de ziekte voor het eerst in Azië gerapporteerd en vanaf 2013 is de ziekte aanwezig in Noord-Amerika.<sup>9</sup>

PEDV veroorzaakt een darminfectie in varkens die gepaard gaat met diarree en een vermindering van de groei. Infectie met het virus kan zorgen voor een zeer hoge mortaliteit onder zogende biggen. Het virus wordt via mest overgedragen.<sup>9</sup>

Het virus is omgeven door een lipidenmembraan en heeft een positief enkelstrengs RNA genoom. Het genoom bestaat uit tenminste 7 open leesramen en codeert voor 16 niet structurele genen, een 'accessory' gen en vier genen die coderen voor de structurele eiwitten 'spike' (S), 'membrane' (M), 'envelope' (E) en 'nucleocapsid' (N).<sup>9</sup> De eiwitten S, M en E zijn aanwezig in het lipidenmembraan en het S eiwit is bepalend voor het tropisme van het virus. Het wild-type PEDV is in de Regeling GGO ingedeeld als een virus van pathogeniteitsklasse 2.

### ***4. Voorgenomen werkzaamheden***

De aanvrager wil twee verschillende soorten gg-virusdeeltjes produceren die afgeleid zijn van VEEV. Hiervoor maakt hij gebruik van de levend geattenueerde vaccinstam TC-83.<sup>10</sup> Om het gg-replicon RNA te produceren zijn de genen die coderen voor de structurele eiwitten vervangen door het gen dat codeert voor GFP of het gen dat codeert voor S van PEDV. De gg-virusdeeltjes worden vervolgens geproduceerd door het gg-replicon RNA samen met twee verschillende helper RNAs in cellen te transfacteren. In deze cellen is volgens de aanvrager geen wild-type VEEV aanwezig. Het ene helper RNA bevat het gen dat codeert voor het C eiwit van VEEV. Het andere helper RNA bevat de genen die coderen voor de glycoproteïnes E1 en E2 van VEEV.<sup>11</sup> De genen die coderen voor de niet-structurele eiwitten en het packagingsignaal zijn volgens de aanvrager niet aanwezig in de helper RNAs. Daarnaast is volgens de aanvrager de 26S promotor uit beide helper RNAs verwijderd, zijn er stopcodons geïntroduceerd in de 5'en 3'UTRs, en is een stopcodon geïntroduceerd op de plaats van het cleavagesignaal na C eiwit. De replicon RNAs en de helper RNAs worden elders geproduceerd.

De aanvrager is voornemens deze RNAs tegelijkertijd in animale cellen te transfecteren om gg-replicondeeltjes te produceren. De geproduceerde gg-replicondeeltjes worden vervolgens gebruikt om de productie te optimaliseren en varkens te vaccineren. Daarnaast wil de aanvrager varkens infecteren met de gg-replicondeeltjes en *in vitro* experimenten uitvoeren met cellen van deze varkens.

## **5. Eerdere COGEM adviezen**

In 2009 heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met op VEEV gebaseerde replicondeeltjes.<sup>12</sup> Deze gg-replicondeeltjes bevatten alleen de genen die coderen voor de niet-structurele eiwitten van VEEV. Tijdens de productie werden de genen die coderen voor de structurele eiwitten *in trans* aangeboden door middel van twee helper RNAs, waardoor het replicon RNA in gg-replicondeeltjes ingepakt kon worden. De helper RNAs bevatten geen packagingsignaal om te voorkomen dat ze in de gg-replicondeeltjes worden ingepakt.

De onderzoekers wilden onderzoeken of zij met behulp van gg-replicondeeltjes de immuunreactie 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 aerogene verspreiding blootgesteld kon worden aan de gg-replicondeeltjes en eventueel aanwezige replicatiecompetente virussen, adviseerde zij enkele additionele maatregelen in acht te nemen.<sup>12</sup>

In 2015 heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met VEEV replicon RNA.<sup>13</sup> In deze gg-replicon RNAs waren de genen van verschillende humane transcriptiefactoren geïntroduceerd. De onderzoekers wilde de gg-replicon RNAs gebruiken om geïnduceerde pluripotente stamcellen te produceren.

De COGEM was van mening dat deze gg-replicon RNAs biologisch ingeperkt zijn, omdat zowel de genen die coderen voor de structurele eiwitten van VEEV als het packagingsignaal niet aanwezig zijn. Omdat door het ontbreken van de structurele eiwitten geen gg-replicondeeltjes gevormd kunnen worden, heeft de COGEM de *in vitro* werkzaamheden ingeschaald op ML-I inperkingsniveau en de *in vivo* werkzaamheden ingeschaald op D-I inperkingsniveau.

## **6. Overweging**

### **6.1 Pathogeniteit van het ggo**

De gg-replicondeeltjes worden geproduceerd door het VEEV replicon RNA met de coderende sequentie van het S eiwit van PEDV samen met twee verschillende helper RNAs te transfecteren. In de cellen worden vervolgens de gg-replicondeeltjes geproduceerd. Op het oppervlakte van deze gg-replicondeeltjes zijn de E1 en de E2 glycoproteïnes van VEEV aanwezig. Daarnaast kunnen mogelijk ook S eiwitten van PEDV op het oppervlakte van de gg-replicondeeltjes aanwezig zijn.

Omdat het S eiwit bepalend is voor het tropisme van PEDV, kan de aanwezigheid van dit eiwit op de gg-replicondeeltjes mogelijk voor een breder gastheerbereik zorgen.

### **6.2 Replicatiecompetent virus**

In theorie zou tijdens het productieproces van de gg-replicondeeltjes replicatiecompetent virus (RCV) kunnen ontstaan. Daarvoor moeten de ontbrekende structurele genen op de juiste manier in het genoom van het replicon RNA geïnsereerd worden. Om de kans op RCV te minimaliseren wordt gebruik gemaakt van een productiesysteem met twee helper RNAs. Door deze helper RNAs worden de ontbrekende structurele eiwitten gecompenseerd. Voor het ontstaan van RCV zijn twee onafhankelijke recombinitie gebeurtenissen noodzakelijk. Volgens de aanvrager is er een beperkte sequentiehomologie tussen de RNAs, waardoor de kans op recombinitie zeer klein zou zijn.

In de wetenschappelijke literatuur wordt de kans op het ontstaan van RCV tijdens de productie van VEE replicondeeltjes met behulp van het twee helper RNA systeem klein geacht.<sup>14,15</sup> In één van de publicaties zijn de geproduceerde replicondeeltjes op verschillende manieren gecontroleerd op de aanwezigheid van RCV.<sup>14</sup> Zelfs met de gevoeligste assay waarmee 1 RCV per milliliter aangetoond kan worden, werd in een batch van  $10^8$  infectieuze VRP's per milliliter geen RCV aangetroffen.

Als extra veiligheidsmaatregel heeft de aanvrager het 26S promoter element uit beide helper RNAs verwijderd, zijn er stopcodons geïntroduceerd in de 5' en 3'UTRs van de helper RNAs, en is er een mutatie in het capsid geïntroduceerd waardoor het capsid zichzelf niet meer kan klieven. Hierdoor zal volgens de aanvrager een eventueel ontstaan RCV nog verder biologisch ingeperkt zijn dan de levend geattenueerde vaccinstam TC-83.<sup>10</sup>

Vanwege de ervaringen die eerder zijn opgedaan bij de productie van gg-replicons, de beperkte sequentiehomologie tussen de helper RNAs en het genoom van het replicon RNA en de beschreven veiligheidsmaatregelen, acht de COGEM de kans op het ontstaan van RCV zeer klein.

### **6.3 Test op RCV**

De aanvrager stelt dat 2060 batches met gg-replicondeeltjes zijn getest op de aanwezigheid van RCV. Hiervoor werd materiaal uit een batch gebruikt om VERO cellen te infecteren, vervolgens is supernatant van deze infectie gebruikt om nieuwe VERO cellen te infecteren. Wanneer er na drie dagen geen cytopathologisch effect (CPE) werd waargenomen, werd de batch beschouwd als RCV vrij. De aanvrager stelt dat in deze test 1 RCV kan worden gedetecteerd in  $1 \times 10^{10}$  gg-replicondeeltjes, maar overlegt hiervan geen onderbouwende gegevens. Volgens de aanvrager is er nog nooit RCV in de batches aangetroffen.

De COGEM verwacht dat tijdens de productie van gg-replicondeeltjes de kans op het ontstaan van RCV zeer klein is. Op basis van de beperkte informatie over de technische specificaties van de RCV test, kan de COGEM niet met zekerheid vaststellen dat het systeem gevalideerd is.

#### **6.4 Complementatie van of recombinitie met een verwant virus**

Een potentieel risico tijdens de voorgenomen werkzaamheden betreft het optreden van recombinitie of complementatie wanneer er wild-type VEEV of een verwant virus in de cellijn of het proefdier aanwezig is. Het VEEV en aan VEEV verwante virussen komen niet voor in Europa. Ook komen de muggensoorten (*Culex melanoconion* spp.) die het virus verspreiden hier niet voor. De aanvrager geeft aan dat de cellen die tijdens de werkzaamheden gebruikt worden vrij zijn van VEEV en aan VEEV verwante virussen. Hierdoor is de COGEM van mening dat de kans op complementatie met of recombinitie met een verwant virus tijdens de werkzaamheden verwaarloosbaar klein is.

#### **6.5 Recombinitie van gg-replicon RNA met wild-type PEDV**

De COGEM is gevraagd of recombinitie met PEDV tijdens een challenge experiment uitgesloten is. Er zijn een aantal voorwaarden waaraan voldaan moet worden om *in vivo* recombinitie tussen twee verschillende virussensoorten te kunnen krijgen. De virussen moeten hetzelfde soort genoom hebben (RNA of DNA), moeten hetzelfde celtype infecteren en in hetzelfde cellulaire compartiment repliceren en er moet een grote mate van sequentie-overeenkomst zijn tussen de virussen. Zowel VEEV als PEDV zijn positief strengige RNA virussen. VEEV replicateert voornamelijk in primaire cellen en PEDV in darmepitheelcellen. Omdat het virussen uit verschillende families afkomstig zijn, is er zeer waarschijnlijk weinig tot geen sequentie-overeenkomst tussen de virussen.

In het geval van een homologe recombinitie zou er uitwisseling kunnen plaatsvinden van het gen dat codeert voor het PEDV S eiwit. Hierdoor ontstaat of het wild-type PEDV of een gg-replicon RNA met het S van het wild-type PEDV. Verder geeft de aanvrager dat de gg-replicondeeltjes cellen kunnen infecteren en de gg-replicons in de cellen kunnen repliceren. Er kunnen echter geen nieuwe gg-replicondeeltjes gevormd worden, omdat de helper RNAs niet aanwezig zijn.

Concluderend is de COGEM van mening dat de kans dat er door recombinitie een virus ontstaat met een pathogeniteit die groter is dan wild-type PEDV verwaarloosbaar klein is.

### **7. Advies**

De COGEM heeft wild-type VEEV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.<sup>16</sup> De aanvrager maakt voor de constructie van gg-replicondeeltjes gebruik van de geattenueerde vaccinstam TC-83 waarin enkele aanvullende attenuerende mutaties geïntroduceerd zijn.

Op basis van de beperkte informatie over de uitgevoerde RCV test kan de COGEM niet uitsluiten dat RCV in de batches aanwezig is. Daarom adviseert de COGEM de productie van gg-replicondeeltjes en de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden met gg-replicondeeltjes uit te voeren op ML-II inperkingsniveau, met als voorbehoud dat de cellen vrij zijn van VEEV of aan VEEV verwante virussen. Verder adviseert de COGEM de infectie van varkens met gg-replicondeeltjes uit te voeren op DM-II inperkingsniveau.

De COGEM merkt hierbij op dat de werkzaamheden mogelijk omlaaggeschaald kunnen worden als de technische specificaties, de gebruikte controles en de wijze waarop de test gevalideerd is, overlegd worden. Als hieruit blijkt dat de RCV test aan de gestelde voorwaarden voldoet en de geproduceerde batches met gg-replicondeeltjes die middels deze test zijn onderzocht vrij zijn van RCV, acht de COGEM de kans op het ontstaan van RCV verwaarloosbaar klein. Onder deze voorwaarde is de COGEM van mening dat de werkzaamheden verder omlaaggeschaald kunnen worden.

Zij adviseert in dat geval de productie van de gg-replicondeeltjes en de *in vitro* werkzaamheden met de gg-replicondeeltjes op ML-I inperkingsniveau, en de *in vivo* werkzaamheden op DM-I inperkingsniveau uit te voeren. Ook hierbij stelt zij als aanvullend voorschrift dat de gebruikte cellen vrij moeten zijn van VEEV en aan VEEV verwante virussen. Gezien het grote aantal geteste batches is de COGEM van mening dat het niet noodzakelijk is om nieuw geproduceerde batches te testen op de aanwezigheid van RCV mits de productie van gg-replicondeeltjes op dezelfde wijze plaatsvindt.

Op deze inperkingsniveaus en onder navolging van de aanvullende voorschriften en de voorschriften die op deze niveaus gelden, is de COGEM van mening dat de veiligheid voor mens en milieu voldoende gewaarborgd is.

## 8. Referenties

1. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: Fields virology, 6th edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
2. 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
3. Weaver SC *et al.* (2004). Venezuelan Equine Encephalitis. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 141-174
4. Griffin DE (2008). Togaviruses: Equine Encephalitic Viruses. In: *Encyclopedia of Virology*, third edition. Ed. Mahy BWJ & Van Regenmortel MHV, Elsevier Ltd.
5. Taylor KG & Paessler S (2013). Pathogenesis of Venezuelan equine encephalitis. *Vet. Microbiol.* 167: 145-150
6. Paessler S & Weaver SC (2009). Vaccines for Venezuelan equine encephalitis. *Vaccine* 27: D80–D85
7. Centers of Disease Control (2009). Geographic distribution of Chikungunya virus. [www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/bmbl.pdf](http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/bmbl.pdf) (bezocht: 9 augustus 2016)
8. De Groot RJ *et al.* (2012) Family *Coronaviridae*. In Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
9. Lee C (2015). Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Viol. J.* 12: 193-209
10. Kinney RM *et al.* (1993). Attenuation of Venezuelan equine encephalitis virus strain TC-83 is encoded by the 5'-noncoding region and the E2 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 67: 1269-1277



11. Kamrud K *et al.* (2010). Development and characterization of promoterless helper RNAs for the production of alphavirus replicon particle. *J. Gen. Virol.* 91: 1723-1727
12. COGEM (2009). Inschaling van werkzaamheden met op het VEE virus gebaseerde replicondeeltjes. COGEM advies CGM/090603-01
13. COGEM (2015). Inschaling van werkzaamheden met replicons afgeleid van het Venezuelan equine encephalitis virus. COGEM advies CGM/150715-01
14. Pushko P *et al.* (1997). Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. *Virology* 239: 389-401
15. Davis NL *et al.* (2000). Vaccination of macaques against pathogenic simian immunodeficiency virus with Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. *J. Virol.* 74: 371-378
16. COGEM (2014). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/141218-02