

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

BEZOEKADRES:  
A. VAN LEEUWENHOEKLAAN 9  
3721 MA BILTHOVEN

POSTADRES:  
POSTBUS 578  
3720 AN BILTHOVEN

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

**DATUM** 06 september 2016  
**KENMERK** CGM/160906-02  
**ONDERWERP** Vervolgadvies omschaling van werkzaamheden met gg-VEEV replicondeeltjes

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van de vervolgadviessvraag met betrekking tot het COGEM advies over de 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 onlangs gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor werkzaamheden met zogenoemde replicons die gebaseerd zijn op het *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV). Deze replicons zijn replicatie-incompetent en kunnen na infectie geen nieuwe virusdeeltjes vormen. De aanvrager wil deze replicons testen in varkens als vaccin tegen het *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV).

In haar advies heeft de COGEM geadviseerd de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau en de *in vivo* werkzaamheden op DM-II inperkingsniveau uit te voeren. Naar aanleiding van dit advies is de COGEM een aanvullende vraag gesteld, waarin zij wordt verzocht uiteen te zetten waarom zij omlaagschaling naar ML-II en DM-II adviseert, terwijl er mogelijk replicatiecompetent virus (RCV) in de te gebruiken batches met replicons aanwezig is.

Hoewel de gevraagde onderbouwing reeds in haar eerdere advies wordt gegeven, is de COGEM gaarne bereid haar argumenten bij genoemde omlaagschaling nogmaals op een rij te zetten en toe te lichten. Gebaseerd op de eigenschappen van het productiesysteem acht de COGEM de kans klein dat tijdens de productie van de replicons RCV zal ontstaan, maar zij kan dit niet geheel uitsluiten. Belangrijk feit is dat het productiesysteem gebaseerd is op een VEEV vaccinstam en niet op het wildtype VEEV. Deze stam is veel minder pathogeen dan het wildtype en is lange tijd gebruikt om paarden en mensen te vaccineren. Daarbij heeft de aanvrager enkele aanvullende mutaties in het productiesysteem aangebracht die een eventueel te vormen RCV nog verder zullen verzwakken en het minder pathogeen maken dan de vaccinstam.

Dus ondanks het feit dat de COGEM de eventuele aanwezigheid van RCV niet geheel kan uitsluiten, is zij van mening dat dit RCV dusdanig verzwakt zal zijn dat de veiligheid voor mens en milieu op de eerder geadviseerde inperkingsniveau's gewaarborgd is.



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 Dr. T. Boekhout niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# Onderbouwing van omlaagschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met gg-VEEV replicons

## COGEM advies CGM/160906-02

### 1. Inleiding

De COGEM heeft onlangs advies uitgebracht over de vergunningaanvraag IG 16-193 getiteld: ‘Omlaagschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met alphavirus RNA deeltjes’ van Intervet International B.V.<sup>1</sup> De aanvrager is van plan om genetisch gemodificeerde (gg-)virusdeeltjes te produceren die afgeleid zijn van het *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV). Hiervoor maakt hij gebruik van de geattenueerde vaccinstam TC-83 waarin de genen die coderen voor de structurele eiwitten vervangen zijn door een gen dat codeert voor het markereiwit GFP of door een gen dat codeert voor een structureel eiwit (Spike-eiwit) van *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV). Deze zogenaamde gg-VEEV replicondeeltjes worden gebruikt om varkens te vaccineren tegen PEDV.

Op basis van de eigenschappen van het productiesysteem en van de gg-VEEV replicondeeltjes heeft de COGEM geadviseerd om de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden in te schalen op ML-II inperkingsniveau en de *in vivo* werkzaamheden op DM-II inperkingsniveau. Naar aanleiding van dit advies heeft het Bureau ggo een vervolgadvisvraag gesteld waarin zij de COGEM verzoekt om nader te onderbouwen waarom zij deze omlaagschaling adviseert, ondanks dat er mogelijk replicatiecompetent virus (RCV) in de batches aanwezig is.

### 2. Overweging bij omlaagschaling van de werkzaamheden

De COGEM wijst erop dat de gevraagde onderbouwing voor de omlaagschaling van de *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met gg-VEEV replicons reeds in het eerdere advies over betreffende vergunningaanvraag wordt gegeven. Zij is echter gaarne bereid om mogelijke onduidelijkheden in haar advies weg te nemen en haar overweging bij deze omlaagschaling nogmaals toe te lichten. Omwille van de duidelijkheid heeft zij de verschillende argumenten die ten grondslag liggen aan het advies hieronder uitgebreid op een rij gezet.

#### 2.1 VEEV vaccinstam vormt basis voor replicon productiesysteem

Het productiesysteem van de gg-replicondeeltjes die in bovengenoemd onderzoek worden gebruikt, is gebaseerd op de VEEV vaccinstam TC-83. Deze vaccinstam is geproduceerd door de virulente VEEV stam *Trinidad donkey in vitro* 83 keer te passeren in hartcellen van cavia's. Ten opzichte van het wildtype VEEV, dat in pathogeniteitsklasse 3 ingedeeld is, is de vaccinstam duidelijk verminderd pathogeen in muizen. Daarbij biedt deze stam een goede bescherming tegen een VEEV infectie in zowel mensen als paarden.<sup>2,3,4</sup> Aanvankelijk werd de TC-83 vaccinstam gebruikt om laboratorium- en veldmedewerkers in te enten, die het risico liepen geïnfecteerd te worden met een virulente stam van VEEV. In totaal zijn er meer dan 5000 individuen met dit vaccin gevaccineerd.<sup>3</sup> Gedurende de 15 jaar dat dit vaccin aan mensen is toegediend, werd het over het algemeen goed verdragen al zijn, als bijwerking, wel lichte tot matige griepachtige symptomen beschreven. Op dit

moment wordt het ‘levende’ TC-83 vaccin in Mexico en Colombia alleen nog gebruikt voor de inenting van paarden. In de Verenigde Staten wordt het in geïnactiveerde vorm verkocht.<sup>5</sup>

### *2.2 gg-VEEV replicondeeltjes zijn replicatie-incompetent*

De aanvrager wil in zijn studie twee verschillende soorten gg-VEEV replicondeeltjes gebruiken. Om het genoom van deze gg-VEEV replicons te construeren zijn uit het genoom van TC-83 de genen die coderen voor de structurele eiwitten verwijderd en vervangen door hetzij een gen dat codeert voor GFP hetzij een gen dat codeert voor het Spike-eiwit van PEDV. Door deze wijzigingen is het gg-VEEV replicon replicatie-incompetent en niet in staat om na infectie nieuwe deeltjes te vormen. Voor de productie van deze replicondeeltjes zijn genoemde structurele genen echter wel vereist en wordt gebruik gemaakt van twee verschillende helper RNAs, die respectievelijk de VEEV glycoproteïnes E1 en E2 en het VEEV C eiwit *in trans* complementeren.

### *2.3 Kans op het ontstaan van replicatiecompetent virus is zeer klein.*

In theorie zou tijdens het productieproces van de gg-replicondeeltjes door recombinatie tussen het replicon RNA en de helper RNAs replicatiecompetent virus (RCV) kunnen ontstaan. Aangezien er volgens de aanvrager slechts een beperkte sequentiehomologie is tussen de te gebruiken RNAs, er voor het ontstaan van RCV twee onafhankelijke recombinatie gebeurtenissen noodzakelijk zijn en op basis van de ervaring die inmiddels met een dergelijk productiesysteem is opgedaan, acht de COGEM de kans op het ontstaan van RCV zeer klein.<sup>6,7</sup> De aanvrager test de geproduceerde batch gg-VEEV replicons op de aanwezigheid van RCV en zal de batch alleen gebruiken als geen RCV gedetecteerd wordt. Aangezien de COGEM van mening is dat onvoldoende inzicht wordt geboden in de specificaties van deze test, kan zij niet geheel uitsluiten dat RCV aanwezig is.

### *2.4 Eventueel gevormd RCV is sterk geattenuëerd*

Op basis van het feit dat het VEEV-replicon productiesysteem gebaseerd is op de vaccinstam TC-83, zal een dubbele recombinatie tussen helper RNAs en replicon RNA in het ergste geval leiden tot het ontstaan van een RCV met vergelijkbare pathogeniteit als de TC-83 vaccinstam. In de onderhavige aanvraag is echter extra veiligheid in het systeem ingebouwd door enkele aanvullende mutaties aan te brengen in de twee helper RNAs. Uit beide helper RNAs is het 26S promoter element verwijderd, zijn stopcodons geïntroduceerd in de 5' en 3'UTRs van de helper RNAs, en is er een mutatie in het capsid gen geïntroduceerd waardoor het capsid zichzelf niet meer kan klieven. Door deze aanvullende mutaties is de COGEM van mening dat een eventueel gevormde RCV nog verder geattenuëerd wordt en derhalve minder pathogeen zal zijn dan de vaccinstam TC-83.

## **3. Conclusie**

De gg-VEEV replicondeeltjes die de aanvrager wil gebruiken zijn replicatie-incompetent en zijn hierdoor niet in staat zich verder te verspreiden. Daarbij acht de COGEM de kans op het ontstaan van RCV tijdens de productie van genoemde gg-VEEV replicondeeltjes zeer klein. Zij kan dit echter niet geheel uitsluiten. Aangezien het productiesysteem is gebaseerd op de geattenuëerde

VEEV vaccinstam TC-83 met enkele aanvullende mutaties in de helper RNA's is zij van mening dat een eventueel ontstaan RCV sterk geattenueerd zal zijn.

Ondanks het feit dat de COGEM niet kan uitsluiten dat de batch met gg-VEEV replicondeeltjes RCV kan bevatten, acht zij de attenuatie van een eventueel gevormd RCV dusdanig dat dit de geadviseerde omlaagschaling van de *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden naar ML-II en DM-II in haar ogen rechtvaardigt. Op deze inperkingsniveaus en onder navolging van de eerder geadviseerde aanvullende voorschriften, is de COGEM van mening dat de veiligheid voor mens en milieu voldoende gewaarborgd is.

#### 4. Referenties

1. COGEM (2016). Inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met replicons afgeleid van *Venezuelan equine encephalitis virus*. COGEM advies CGM/160815-01
2. 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
3. Burke DS *et al.* (1977). Persistence in humans of antibody to subtypes of Venezuelan Equine Encephalomyelitis (VEE) Virus after immunization with attenuated (TC-83) VEE virus vaccine. *J. Infect. Dis.* 136:354-359
4. Walton TE *et al.* (1972). Epizootic Venezuelan equine encephalomyelitis in Central America. Disease pattern and vaccine evaluation in Nicaragua, 1969-1970. *Am. J. Epidemiol.* 95:247-254
5. Paessler S & Weaver SC (2009). Vaccines for Venezuelan equine encephalitis. *Vaccine* 27: D80–D85
6. 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
7. 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