

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

**DATUM** 21 december 2016  
**KENMERK** CGM/161221-01  
**ONDERWERP** Adviesvraag inschaling werkzaamheden met HIV-Env gepseudotypeerd gg-VSIV

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 16-315\_2.8-000, getiteld “*Productie van genetisch gemodificeerd Vesicular stomatitis virus (gg-VSV)*” ingediend door Batavia Biosciences 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). De aanvrager wil een VSIV produceren waarin het gen dat codeert voor een eiwit betrokken bij de infectie van cellen (G-eiwit) vervangen is door een gen van het *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1). Het gg-VSIV wordt vervolgens opnieuw voorzien van het G-eiwit, zonder dat het gen aanwezig is in het virusdeeltje. Het onderzoek vindt plaats in het kader van vaccinontwikkeling. De aanvrager verzoekt een omlaagschaling van de werkzaamheden van niveau ML-III naar ML-II.

De COGEM is van mening dat het geproduceerde gg-VSIV, en gg-VSIV met G-eiwit minder schadelijk is dan het originele VSIV. De COGEM merkt echter op dat het theoretisch mogelijk is dat het gen van het G-eiwit van VSIV tijdens het productieproces door recombinatie teruggeplaatst wordt in het virusdeeltje

Aangezien op basis van de aangeleverde gegevens niet uitgesloten kan worden dat er recombinatie plaatsvindt, acht de COGEM de milieurisico's van een omlaagschaling van ML-III naar ML-II alleen verwaarloosbaar klein indien goed gevalideerde testen op recombinanten negatief zijn, en enkele aanvullende voorschriften worden nagevolgd.



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

# Inschaling werkzaamheden met HIV-Env gepseudotypeerd gg-*Vesicular stomatitis Indiana virus* (VSIV)

## COGEM advies CGM/161221-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Vesicular stomatitis Indiana virus* (gg-VSIV) (IG 16-315). De aanvrager is van plan een gg-VSIV te produceren, waarin het glycoproteïne (G)-eiwit van VSIV is vervangen door het envelopeiwit van het *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1). Dit chimere virus (genaamd VSVΔG-ENV.BG505), wordt vervolgens gepseudotypeerd met het G-eiwit van VSIV of van *Vesicular stomatitis New Jersey virus* (VSNJV). De handelingen zullen worden uitgevoerd ten behoeve van een vaccinontwikkeling tegen HIV. De aanvrager stelt voor om de werkzaamheden met VSVΔG-ENV.BG505 en G-eiwit gepseudotypeerd VSVΔG-ENV.BG505 omlaag te schalen van ML-III naar ML-II, met inachtneming van enkele aanvullende voorschriften.

### 2. *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.<sup>1</sup> De soorten VSIV en VSNJV verschillen onder meer van elkaar op basis van de epitopen van het G-eiwit.<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup>

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.<sup>3</sup> 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.<sup>4</sup> Hoewel de mortaliteit in dieren zeer laag is, bestaat er nog geen specifieke behandeling tegen de ziekte.<sup>4</sup> De meeste dieren die geïnfecteerd raken met VSIV herstellen binnen twee weken.<sup>4</sup> 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.<sup>2,3</sup> 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.<sup>3</sup> Verspreiding tussen mensen onderling is tot op heden niet in de literatuur gerapporteerd.<sup>5</sup> 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).<sup>2</sup> 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.<sup>3</sup> Het G-eiwit vormt samen met het membraan de envelop van het virus. Dit eiwit is verantwoordelijk voor de verankering aan en fusie met de gastheer cel.<sup>2</sup> Het M-eiwit heeft een belangrijke rol in de constructie van het virus, virus ‘budding’ en de apoptose van de cel.<sup>3</sup>

### **3. Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)**

Het *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1) behoort tot het genus *Lentivirus* binnen de familie van de *Retroviridae* en veroorzaakt het verworven immuundeficiëntie syndroom ‘AIDS’. Het genoom van HIV-1, dat vaak wordt gebruikt als basis voor de ontwikkeling van lentivirale vectoren, bevat naast de structurele genen (*gag*, *pro*, *pol* en *env*) een viertal accessoire genen (*vif*, *vpr*, *vpu* en *nef*) en twee regulatoire genen (*tat* en *rev*).<sup>6</sup> Het tropisme van lentivirussen wordt bepaald door het virale envelop-eiwit (Env). Het primaire target van HIV zijn CD4 receptoren van T-lymfocyten en in mindere mate macrofagen en monocyten. De infectie van deze CD4+ immuuncellen leidt tot replicatie en verspreiding van HIV en vormt de basis voor de uiteindelijke aftakeling van het immuunsysteem.<sup>7</sup> De transmissie van HIV vindt voornamelijk plaats via seksueel contact, via bloed, en van moeder op kind. Besmetting door niet-seksuele contacten en blootstelling aan speeksel of urine van geïnfecteerde personen is nagenoeg uitgesloten.<sup>8</sup>

### **4. Genetisch gemodificeerd VSIV (VSVΔG-ENV.BG505)**

De aanvrager wil een gg-VSIV produceren, genaamd VSVΔG-ENV.BG505. Deze virale vector wordt geconstrueerd door het gen dat codeert voor het VSV G-eiwit te deleteren en te vervangen door de sequentie van het HIV-Env trimeer glycoproteïne (cladeA.Env.BG505). Het HIV *env* gen is geoptimaliseerd voor gebruik in VSIV door onder andere de Env transmembrane en cytoplasmatische domeinen te vervangen door de domeinen afkomstig van VSIV G-eiwit wat resulteert in het *envG* gen.<sup>9</sup> Deletie van de sequentie van het VSIV G-eiwit heeft tot gevolg dat gg-VSIV niet meer in staat is om te binden aan de gastheer cel, maar door de aanwezigheid van het HIV Env-eiwit in VSVΔG-ENV.BG505 kan het virus wel binden aan en repliceren in CD4+/CCR5+ cellen.

Ook wil de aanvrager een VSVΔG-ENV.BG505 virus produceren dat gepseudotypeerd is met het VSIV of VSNJV G-eiwit. Het gastheerbereik van het G-eiwit gepseudotypeerd VSVΔG-ENV.BG505 is breder dan voor VSVΔG-ENV.BG505, maar door de pseudotypering is alleen een ‘single-round’ infectie mogelijk en zullen alle volgende replicatieronden gelimiteerd zijn door het HIV Env-eiwit.

### **5. Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft in 2012 geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met replicatiecompetente VSIV deeltjes, waarin het gen dat codeert voor het virale glycoproteïne is vervangen door een sequentie die codeert voor het glycoproteïne van het Ebolavirus of het Marburgvirus.<sup>10</sup> 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.<sup>10</sup>

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.<sup>11</sup>

In mei 2016 heeft de COGEM een advies uitgebracht over de omlaagschaling van werkzaamheden met gg-VSIV dat gepseudotypeerd is met het glycoproteïne van het ebolavirus of het marburgvirus. De COGEM achtte het gg-VSIV verzwakt en de kans op recombinatie tijdens de productie verwaarloosbaar klein. De COGEM adviseerde de voorgenomen werkzaamheden met gepseudotypeerd, 'single-round' gg-VSIV in te schalen op ML-II niveau.<sup>12</sup>

## 6. Voorgenomen werkzaamheden

### *Productie VSVΔG-ENV.BG505*

De aanvrager wil VSVΔG-ENV.BG505 produceren met behulp van Vero cellen, i.e., een cellijn geïsoleerd van nierepitheelcellen afkomstig van een groene meerkat (*Chlorocebus* sp.), en VERT-3 cellen, i.e., Vero cellen die getransfecteerd zijn met een CD4/CCR5 expressiecassette en hierdoor stabiel CD4 en CCR5 tot expressie brengen. De COGEM merkt op dat het dossier onduidelijke en tegenstrijdige informatie bevat over het productieproces van VSVΔG-ENV.BG505.

De COGEM veronderstelt dat voor de virusproductie Vero cellen geëlectroporeerd worden met een plasmide met het gemodificeerde VSIV-genoom cDNA, een plasmide coderend voor T7 RNA polymerase om genomisch RNA te synthetiseren, en helperplasmiden die de N-, P-, L-, M- en G-eiwitten van VSIV tot expressie brengen om de virusrePLICATIE te initiëren. Hieruit zal een VSVΔG-ENV.BG505 virus ontstaan dat zowel het HIV Env als het G-eiwit bevat. Vervolgens wordt een 'triple plaque purificatie' toegepast om klonaal VSVΔG-ENV.BG505 te produceren dat alleen het HIV Env bevat. Vanwege de aanwezigheid van het HIV Env-eiwit kan het VSVΔG-ENV.BG505 virus op deze VERT-3 cellen zelfstandig repliceren.

### *Productie VSVΔG-ENV.BG505 gepseudotypeerd met het VSIV/VSNJV-G eiwit*

Na de productie van VSVΔG-ENV.BG505 wordt het virus gepseudotypeerd met het G-eiwit van het VSIV of VSNJV. G-eiwit-gepseudotypeerd VSVΔG-ENV.BG505 wordt verkregen door VERT-3 cellen te infecteren met VSVΔG-ENV.BG505 en deze cellen vervolgens te electroporeren met plasmiden die coderen voor de sequenties van het VSIV-G (pCneo-del7-VSV-Gin) of VSNJV-G (pCneo-delT7-VSV-Gnj). Beide G-eiwit plasmiden bevatten volgens de aanvrager geen extra VSIV sequenties. De geëlectroporeerde VERT-3 cellen brengen de G-eiwitten (Gin of Gnj) transiënt tot expressie, waardoor Gin/Gnj-eiwit gepseudotypeerd VSVΔG-ENV.BG505 geproduceerd wordt dat voor klinische studies gebruikt kan worden.

## 7. Overweging

De aanvrager wil werkzaamheden uitvoeren met VSVΔG-ENV.BG505, al dan niet gepseudotypeerd met het glycoproteïne van VSIV of VSNJV. Het VSVΔG-ENV.BG505 is replicatiecompetent maar vanwege het zeer beperkte gastheerbereik, – het kan alleen infecteren of repliceren in CD4+/CCR5+ cellen –, acht de COGEM de pathogeniteit sterk verminderd. Het G-eiwit gepseudotypeerde VSVΔG-ENV.BG505 heeft een groter gastheerbereik door de aanwezigheid van het VSIV/VSNJV glycoproteïne, maar kan slechts eenmalig een infectie veroorzaken. De COGEM is daarom van mening dat ook G-eiwit-gepseudotypeerd VSVΔG-ENV.BG505 minder pathogeen is dan wildtype VSIV.

### *Kans op recombinatie bij de productie van VSVΔG-ENV.BG505*

De COGEM merkt op dat recombinatie tijdens het productieproces, waarbij het gen dat codeert voor het G-eiwit terug geplaatst wordt in het gg-VSIV genoom, theoretisch mogelijk is. Hieruit zou een virus kunnen ontstaan dat vergelijkbaar is met het wildtype VSIV. Volgens de door de aanvrager bijgeleverde wetenschappelijke literatuur is het HIV *env* gen op het gemodificeerde VSIV-genoom cDNA dusdanig aangepast dat er sequenties van het cytoplasmatische en transmembrane domein van het G-eiwit in verwerkt zijn. Deze sequenties zijn ook aanwezig op het G-eiwit plasmide, waardoor de kans op recombinatie tijdens het productieproces verhoogd wordt.

### *Kans op recombinatie bij de productie van VSIV/VSNJV-G VSVΔG-ENV.BG505*

Bij de productie van Gin/nj-eiwit-gepseudotypeerd VSVΔG-ENV.BG505 wordt het VSIV/VSNJV G-eiwit plasmide geëlectroporeerd in VSVΔG-ENV.BG505-geïnfecteerde VERT-3 cellen. Omdat hier gebruikt gemaakt wordt van een RNA virus in combinatie met een DNA plasmide is de kans op recombinatie minimaal. Recombinatie tussen viraal RNA en mRNA afkomstig van het plasmide is zeer onwaarschijnlijk. Recombinatie van negatieve (ss)RNA virussen is zeer zeldzaam.<sup>13</sup> De *Rhabdoviridae* staan nauwelijks bekend om het ontstaan van recombinanten. Ook is recombinatie tussen verschillende vesiculo stomatitis virusstammen tot op heden nog niet bekend.<sup>14,15</sup> Op basis van deze gegevens acht de COGEM de kans op recombinatie bij de productie van VSIV/VSNJV G-eiwit gepseudotypeerd VSVΔG-ENV.BG505 zeer tot verwaarloosbaar klein, maar theoretisch niet volledig uit te sluiten.

### *Testen op recombinatie*

De aanvrager stelt dat er verschillende testen uitgevoerd worden (virus-propagatie testen op verschillende cellijnen en G-eiwit-expressie testen) om aan te tonen dat er geen recombinatie plaats heeft gevonden. De COGEM is echter van mening dat deze testen onvoldoende gevalideerd zijn. De beschrijving van de gebruikte assay's is erg beperkt; zo wordt er geen informatie gegeven over de detectielimiet. Hierdoor is niet met zekerheid vast te stellen dat er daadwerkelijk geen recombinant virus aanwezig is in de vectorbatches.

## 8. Advies

Op basis van de aangeleverde informatie acht de COGEM VSVΔG-ENV.BG505 sterk verzwakt ten opzichte van het wildtype VSIV. Vanwege het beperkte gastheerbereik en bij uitvoering van de werkzaamheden op niveau ML-II, zijn de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein. Echter, de COGEM kan niet uitsluiten dat tijdens het productieproces recombinatie plaatsvindt. De COGEM acht een omlaagschaling van ML-III naar ML-II daarom alleen verantwoord indien er een goed gevalideerde assay uitgevoerd wordt waarmee aangetoond wordt dat VSIV-G RNA niet aanwezig is in VSVΔG-ENV.BG505. Tevens adviseert zij de volgende aanvullende werkvoorschriften in acht te nemen:

- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen.
- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse-II uitgevoerd.

Samenvattend acht de COGEM de risico's van omlaagschaling naar niveau ML-II alleen verwaarloosbaar klein als een gevalideerde test aantoont dat er geen incorporatie van het G-eiwit gen plaats heeft gevonden in VSVΔG-ENV.BG505.

## 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. Edited by: Knipe MD and Howley PM. Philadelphia: 1221-1244
3. Lichty 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](http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/stomatit-eng.php) (13 december 2016)
6. Knipe DM and Howley PM (eds) (2001) Fields Virology, vol 2:1971-2042
7. Knipe DM and Howley PM (eds) (2001) Fields Virology, vol 2:2043-2094
8. Flint SJ *et al.* (eds.) (2004) Principles of Virology. Second edition 633
9. Rabinovich S *et al.* (2014). A novel, live-attenuated *Vesicular stomatitis virus* vector displaying conformationally intact, functional HIV-1 envelope trimers that elicits potent cellular and humoral responses in mice. PLoS One. 9:e106597
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. COGEM (2016). Omlaagschaling van werkzaamheden met gepseudotypeerd, 'single-round' genetisch gemodificeerd *Vesicular stomatitis Indiana virus*. COGEM advies CGM/160502-04

13. Simon-Loriere E & Holmes EC (2011). Why do RNA viruses recombine? *Nat. Rev. Microbiol.* 9:617-626
14. Worobey M & Holmes CE (1999). Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology*, 80:2535-2543
15. Han GZ & Worobey M (2011). Homologous recombination in negative sense RNA viruses. *Viruses*, 3: 1358-1373