

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
Mevrouw drs. S. van Veldhoven-van der Meer
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 25 oktober 2018
KENMERK CGM/181025-01
ONDERWERP Advies inschaling van werkzaamheden met recombinant VSIV- Lassa virus

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 18-163_2.8-000 getiteld: 'Productie van genetisch gemodificeerd Vesicular stomatitis virus' ingediend door Batavia Biosciences B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV) dat het manteleiwit van het Lassa virus (LASV) bevat (VSV Δ G/LASVGPC). De aanvrager verzoekt de werkzaamheden op ML-II niveau te mogen uitvoeren.

Wildtype VSIV veroorzaakt een ziekte in vee met symptomen die lijken op mond-en-klauwzeer. De COGEM heeft VSIV als een klasse 3 dierpathogeen geclassificeerd. Conform de Regeling ggo zouden de werkzaamheden met het gg-virus minimaal op ML-III inperkingsniveau uitgevoerd moeten worden.

Op basis van resultaten uit verschillende studies bij mens en dier acht de COGEM het aannemelijk dat VSV Δ G/LASVGPC voldoende geattenuerd is ten opzichte van het wildtype VSIV om omlaagschaling van de voorgenomen werkzaamheden van ML-III naar ML-II niveau te rechtvaardigen.


Om te voorkomen dat de laboratoriummedewerker besmet raakt met VSV Δ G/LASVGPC en om eventuele verspreiding en uitsleep van het gg-virus naar bevattelijke dieren te minimaliseren, adviseert de COGEM enkele aanvullende werkvoorschriften in acht te nemen.

Op genoemd inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende werkvoorschriften 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 IenW

Inschaling van werkzaamheden met Vesicular stomatitis Indiana virus voorzien van het oppervlakte-eiwit van Lassa virus

COGEM advies CGM/181025-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met replicatiecompetent Vesicular stomatitis Indiana virus, waarvan het oppervlakte-eiwit verwisseld is met dat van het Lassa virus (IG 18-163). De aanvrager wil het genetisch gemodificeerde (gg-) virus produceren, opzuiveren en karakteriseren, en verzoekt de werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau uit te mogen voeren onder inachtneming van enkele aanvullende werkvoorschriften.

Vesicular stomatitis Indiana virus

Het Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV, ook wel VSV genoemd) behoort binnen de familie van de *Rhabdoviridae* tot het genus *Vesiculovirus*. De 'International Committee on Taxonomy' (ICTV) heeft in 2016 de soortnaam van VSIV gewijzigd in *Indiana vesiculovirus*.¹

VSIV heeft als primaire gastheren knaagdieren, vee, varkens en paarden.² Het virus is enzoötisch in de Verenigde Staten, Midden-Amerika en een deel van Zuid-Amerika, en veroorzaakt vesiculaire stomatitis bij runderen, schapen, varkens en paarden. Deze ziekte wordt gekenmerkt door blaasjes op de tong, het tandvlees, de uiers en de hoeven van de dieren, en lijkt sterk op mond-en-klauwzeer. Vesiculaire stomatitis is besmettelijk en in Nederland aangifteplichtig.^{3,4,5,6} Een uitbraak van VSIV kan tot grote economische schade leiden. Het virus wordt overgedragen door insecten, via direct contact met wondjes op de huid van besmette dieren, of via inhalatie van virus bevattende aërosolen.^{3,4}

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.^{2,4} De meeste humane infecties verlopen zonder klinische verschijnselen. Mensen die wel ziek worden, ontwikkelen in eerste instantie hoge koorts gevolgd door griepachtige symptomen.² Verspreiding tussen mensen onderling is niet in de literatuur gerapporteerd.⁷

VSIV is een kogelvormig niet-gesegmenteerd negatief enkelstrengs RNA-virus dat omhuld wordt door een membraan.^{2,4} Het genoom codeert voor vijf eiwitten: het 'nucleoprotein' (N), het 'phosphoprotein' (P), het 'large protein' (L), het 'matrixprotein' (M) en het 'glycoprotein' (G). De N-, L- en P-eiwitten vormen een RNA-afhankelijk RNA-polymerase complex dat verantwoordelijk is voor zowel virale transcriptie als replicatie. Het G-eiwit zit in het membraan verankerd en is betrokken bij de hechting aan en fusie met de gastheercel. Het M-eiwit speelt een belangrijke rol in de constructie van het virus, virus 'budding' en apoptose (geprogrammeerde celdood).⁴ VSIV kent een breed celtropisme. In de literatuur wordt verondersteld dat niet-specifieke elektrostatische en hydrofobe interacties de aanhechting van VSIV aan cellen mediëren.⁴

Lassa virus

Het Lassa virus (LASV) behoort binnen de familie van de *Arenaviridae* tot het genus *Mammarenavirus*. De 'International Committee on Taxonomy' (ICTV) heeft in 2014 de soortnaam van LASV gewijzigd in *Lassa mammarenavirus*.⁸ LASV veroorzaakt bij de mens een zeer ernstig ziektebeeld (Lassakoorts) dat in aanvang gekenmerkt wordt door (buik)griepachtige verschijnselen, en vervolgens kan leiden tot hemorragische koorts met een fatale afloop. De natuurlijke gastheren van LASV zijn bepaalde knaagdieren (*Mastomys* spp), die in West-Afrika voorkomen.⁹

LASV heeft een negatief enkelstrengs gesegmenteerd RNA genoom. Het virusdeeltje wordt omhuld door een membraan. Het genoom codeert voor vier eiwitten en bestaat uit twee segmenten: large (L) en small (S). Het L RNA codeert voor het membraanproteïne (Z) en het virale polymerase (L). Het S RNA codeert voor het precursor glycoproteïne (GPC) en het nucleoproteïne (NP). Het GPC is een trimeer dat na translatie wordt gekliefd in de subunits SSP, glycoproteïne 1 (GP1) en glycoproteïne 2 (GP2).^{10,11} Het SSP is een transmembraan signaalpeptide en essentieel bij infectie van de gastheercel. Het GP1 bindt aan de celreceptor en bepaalt het tropisme van het virus. Het GP2 is betrokken bij de fusie van het virusdeeltje aan de celmembraan. LASV kent een breed celtropisme, waarbij het alpha-dystroglycaan (α -DG) gezien wordt als de belangrijkste celreceptor.¹¹

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil een vaccin tegen Lassakoorts produceren. Het vaccin bestaat uit replicatie-competent VSIV dat in plaats van het natieve G-eiwit het oppervlakte-eiwit van LASV tot expressie brengt. Daartoe is het gen coderend voor het G-eiwit van VSIV vervangen door het gen coderend voor het GPC-eiwit van LASV (VSV Δ G/LASVGPC), zoals beschreven door Garbutt *et al.*¹² De vergunningaanvraag betreft het vermeerderen van VSV Δ G/LASVGPC virusdeeltjes op Verocellen, en het opzuiveren en karakteriseren van deze virusdeeltjes. De aanvrager geeft aan dat voor het genereren van VSV Δ G/LASVGPC geen gebruik gemaakt is van een plasmide dat het G-eiwit van VSIV tot expressie brengt.

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft geadviseerd VSIV in pathogeniteitsklasse 3 en LASV in pathogeniteitsklasse 4 in te delen.^{13,14,15,16} Daarnaast heeft zij meerdere malen geadviseerd over op VSIV gebaseerde replicatie-competente chimere die heterologe oppervlakte-eiwitten tot expressie brachten.^{13,14,17}

In 2011 heeft de COGEM geadviseerd over laboratoriumstam VSIV-San Juan waarin het gen coderend voor het G-eiwit vervangen was door genen coderend voor fusie-eiwitten afkomstig van een breed scala aan virussen (onder meer *Influenzavirus A*, coronavirussen, rhabdovirussen, paramyxovirussen, bunyavirussen en baculovirussen).¹³ Omdat de attenuatie van de te gebruiken VSIV-stam onvoldoende was onderbouwd en de consequenties van een ontsnapping van de replicatiecompetente gg-virussen naar het milieu aanzienlijk zouden zijn, adviseerde de COGEM de werkzaamheden in te schalen op ML-III niveau.

In 2012 heeft zij geadviseerd over werkzaamheden met VSIV waarin het gen coderend voor het G-eiwit vervangen was door genen coderend voor het G-eiwit van het *Zaire ebolavirus* of het Lake

Victoria marburgvirus.¹⁷ Omdat de aangeleverde literatuurgegevens niet overtuigend bewezen dat het replicatiecompetente gg-VSIV geattenuerd was ten opzichte van wildtype VSIV, adviseerde de COGEM de werkzaamheden in te schalen op ML-III niveau.

In 2016 heeft de COGEM ook geadviseerd over VSIV waarin het gen coderend voor het G-eiwit vervangen was door het gen coderend voor het G-eiwit van het *Zaire ebolavirus* (gg-VSIV-ZEBOV).¹⁴ Op basis van vaccinatiestudies bij mensen, een studie met non-humane primaten en een studie met varkens, achtte de COGEM het aannemelijk dat het gg-VSIV-ZEBOV vaccin voldoende geattenuerd was ten opzichte van het wildtype VSIV om omlaagschaling van de voorgenomen werkzaamheden van ML-III naar ML-II niveau te rechtvaardigen. De COGEM kon echter niet uitsluiten dat een eventuele besmette medewerker het gg-virus in het milieu zou uitscheiden. Om te voorkomen dat de medewerker besmet zou raken met gg-VSIV-ZEBOV en om eventuele verspreiding van het gg-virus naar landbouwhuisdieren te minimaliseren, adviseerde de COGEM de volgende aanvullende werkvoorschriften in acht te nemen:

- open handelingen worden uitgevoerd in een VK-II kabinet,
- tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen,
- laboratoriummedewerkers mogen geen contact hebben met varkens, grote en kleine herkauwers en paarden tot drie dagen na het werken met gg-VSIV-ZEBOV.

Overwegingen en advies

De aanvrager wil laboratoriumwerkzaamheden uitvoeren met replicatiecompetent chimeer VSIV dat het buitenmembraaneiwit van LASV (een klasse 4 virus) tot expressie brengt (VSVΔG/LASVGPC). Conform de Regeling genetisch gemodificeerde organismen zou een dergelijk chimeer virus minimaal op ML-III inperkingsniveau ingeschaald moeten worden.

De aanvrager is van mening dat het gg-virus voldoende geattenuerd is ten opzichte van wildtype VSIV om een inschaling op ML-II niveau te rechtvaardigen. Ter onderbouwing hiervoor verwijst hij naar verschillende *in vitro* en *in vivo* studies met VSVΔG/LASVGPC.^{12,18,19,20} Tevens verwijst hij naar een COGEM advies uit 2016. Hierin wordt geadviseerd werkzaamheden met replicatiecompetent chimeer VSIV-Ebolavirus (gg-VSIV-ZEBOV) op ML-II in te schalen.¹⁴ Dit gg-virus is op dezelfde 'backbone' gebaseerd als dat van de voorliggende vergunningaanvraag, en brengt eveneens een buitenmembraaneiwit van een klasse 4 virus tot expressie.

De COGEM is van oordeel dat de door de aanvrager aangeleverde *in vitro* studies met muizen- en rattencellen laten zien dat de neurotoxiciteit van VSVΔG/LASVGPC verminderd is.¹² De aangeleverde *in vivo* studies bij non-humane primaten, muizen, ratten en cavia's laten zien dat VSVΔG/LASVGPC een verminderd replicerend vermogen heeft, en verminderd pathogeen is ten opzichte van wildtype VSIV.^{12,18,19,20} Tevens merkt de COGEM op dat gg-VSIV-ZEBOV (met dezelfde backbone als VSVΔG/LASVGPC) bij de mens veilig is gebleken en alleen milde bijwerkingen geeft, zoals vasculitis, dermatitis en artritis.^{21,22,23} Het voorgaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat VSVΔG/LASVGPC voldoende geattenuerd is ten opzichte van wildtype VSIV om omlaagschaling van de voorgenomen werkzaamheden van ML-III naar ML-II niveau te rechtvaardigen.

De COGEM merkt op dat VSVΔG/LASVGPC replicatiecompetent is en zowel mens als dier kan infecteren. Om te voorkomen dat de medewerker besmet raakt met het VSVΔG/LASVGPC vaccin adviseert zij de volgende aanvullende werkvoorschriften in acht te nemen:

- open handelingen worden uitgevoerd in een VK-II kabinet;
- tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen.

De COGEM wijst er op dat, wanneer er in het onderzoeksveld of bedrijfsleven gewerkt wordt met aangifteplichtige diervirussen, het gebruikelijk is dat een laboratoriummedewerker tot drie dagen na het uitvoeren van experimenten met deze virussen geen contact heeft met dieren die voor deze virussen bevattelijk zijn. Zij adviseert de aanvrager deze gangbare beheersmaatregel na te volgen ten einde de kans op een eventuele besmetting van bevattelijke dieren met VSVΔG/LASVGPC te minimaliseren, en de impact van mogelijke consequenties te voorkomen.

Omdat gg-VSIV-ZEBOV de laatste jaren steeds vaker wordt toegepast en meer gegevens over mogelijke verspreiding en veiligheid beschikbaar komen, is de COGEM van plan om in een later stadium de in haar eerdere advies¹⁴ gestelde beheersmaatregelen, met name de bovengenoemde, voor dit en vergelijkbare virusvaccins tegen het licht te houden.

Op genoemd inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende werkvoorschriften acht de COGEM de risico's van de voorgenoemde werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses. The online (10th) report of the ICTV. *Indiana vesiculovirus*. https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20171794 (bezoekt: 15 oktober 2018)
2. Lichty BD *et al.* (2004). Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol. Med.* 10: 210-216
3. Letchworth GJ *et al.* (1999). Vesicular stomatitis. *Vet. J.* 157: 239-60
4. Lyles DS *et al.* (2013). *Rhabdoviridae*. In: *Fields Virology*, 6th ed.. Ed. Knipe MD & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
5. Wettenbank. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0018397/2018-10-01> (bezoekt: 16 oktober 2018)
6. Nederlandse Voedsel- en Waren Autoriteit. www.nvwa.nl/onderwerpen/dierziekten/lijt-aangifteplichtige-dierziekten/aangifteplichtige-dierziekten-bij-vee (bezoekt: 16 oktober 2018)
7. Public Health Agency of Canada (2012). www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/vesicular-stomatitis-virus.html (bezoekt: 16 oktober 2018)
8. International Committee on Taxonomy of Viruses (2018). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
9. Buchmeier MJ *et al.* (2013). *Arenaviridae*. In: *Fields Virology*, 6th ed.. Ed. Knipe MD & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

10. Yun NE & Walker DH (2012). Pathogenesis of Lassa fever. *Viruses* 4: 2031-2048
11. Hastie KM & Saphire EO (2018). Lassa virus glycoprotein: stopping a moving target. *Curr. Opin. Virol.* 31: 52-58
12. Garbutt M *et al.* (2004). Properties of replication-competent Vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of Filoviruses and Arenaviruses. *J. Virol.* 78: 5458-5465
13. COGEM (2011). Classificatie van Vesicular stomatitis virus en inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde VSV deeltjes. COGEM advies CGM/110815-03
14. COGEM (2016). Omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) Vesicular stomatitis Indiana virus. COGEM advies CGM/160310-01
15. COGEM (2017). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/170522-03
16. COGEM (2013). Classificatie van humaan- en dierpathogene RNA virussen. COGEM advies CGM/131031-02
17. COGEM (2012). Inschaling van onderzoek naar Ebolavirus en Marburgvirus infecties met genetisch gemodificeerd VSIV. COGEM advies CGM/120417-02
18. Geisbert TW *et al.* (2005). Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever. *PLoS Med.* 2: 537-545
19. Safronetz D *et al.* (2015). A recombinant Vesicular stomatitis virus-based Lassa fever vaccine protects guinea pigs and macaques against challenge with geographically and genetically distinct Lassa viruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* DOI:10.1371/journal.pntd.0003736
20. Wollmann G *et al.* (2015). Lassa-Vesicular stomatitis chimeric virus safely destroys brain tumors. *J. Virol.* 89: 6711-6724
21. Henao-Restrepo *et al.* (2015). Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial. *Lancet* 386: 857-866
22. Agnandji ST *et al.* (2016). Phase 1 trials of rVSV Ebola vaccine in Africa and Europe. *N. Engl. J. Med.*
23. Huttner A *et al.* (2015). The effect of dose on the safety and immunogenicity of the VSV Ebola candidate vaccine: a randomised double-blind, placebo-controlled phase 1/2 trial. *Lancet Infect. Dis.* 15: 1156-1166