

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 23 juli 2007
KENMERK CGM/070723-02
ONDERWERP Advies werkzaamheden met een recombinante Semliki forest virus vector

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de inschaling van werkzaamheden met een *Semliki forest virus* vector die de lichte eiwitketen van het botuline neurotoxine type A, C of E tot expressie brengt door de Vereniging voor christelijk hoger onderwijs, wetenschappelijk onderzoek en patiëntenzorg van de Vrije Universiteit te Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd (gg) *Semliki forest virus* waarin de zogenaamde lichte keten van het botuline toxine is gezet. De aanvrager wil onder andere met dit virus de signaaloverdracht van hersenzogdiercellen onderzoeken. De aanvrager heeft al een vergunning om met dit virus te werken op ML-III niveau maar heeft verzocht de werkzaamheden te mogen uitvoeren op ML-II niveau.

Het Botuline toxine bestaat normaliter uit een zware en een lichte keten. De combinatie van deze twee ketens maakt botuline zeer toxisch, doordat het de overdracht van zenuwpulsen tussen dierlijke cellen blokkeert. De lichte keten alleen kan geen cellen infecteren en de COGEM is dan ook van mening dat de lichte keten van het botuline toxine niet beschouwd kan worden als een toxine uit de hoogste toxiciteitsklasse (T-3).

Het is van belang dat het gg-virus zich niet kan verspreiden in het milieu. Het virus is naar de mening van de COGEM zo aangepast dat het zich niet meer zelfstandig kan repliceren. Zij acht de kans verwaarloosbaar klein dat er tijdens de experimenten een virus kan ontstaan dat de lichte keten van het botuline bevat en daarnaast in staat is te repliceren. De COGEM is daarom van mening dat laboratoriumhandelingen met dit gg-virus kunnen plaatsvinden onder ML-II niveau. Om eventuele risico's, zoals infectie van de medewerker met het gg-virus, verder te minimaliseren dienen aanvullende voorschriften, zoals beschreven in het advies, in acht genomen te worden.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right, ending in a small hook.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

***Semliki forest virus* vector met een transgen voor de lichte keten van botuline neurotoxine**

COGEM advies CGM/070723-02

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een recombinant *Semliki forest virus* (rSFV) vector. De aanvrager geeft aan dat deze vector replicatiedeficiënt is en een transgen bevat dat codeert voor de lichte keten van het Botuline Neurotoxine (BoNT) van het type A, C of E. De aanvrager is van plan dit virus te produceren en vervolgens *in vitro* te gebruiken om de signaaloverdracht in hersencellen van zoogdieren te bestuderen. De aanvrager heeft gevraagd de handelingen met de rSFV vector te mogen uitvoeren op ML-II inperkingsniveau.

Semliki forest virus

Het *Semliki forest virus* (SFV) is een positief strengs (+) RNA virus en behoort tot de Alphavirussen uit de familie van de *Togaviridae* (1). In tegenstelling tot de meeste andere togavirussen wordt SFV beschouwd als weinig gevaarlijk voor mensen. SFV wordt overgebracht door muggen en kan via deze vector mensen infecteren. De infectie resulteert in een subklinisch, mild ziektebeeld met onder andere koorts en hoofdpijn als kenmerken. In paarden, muizen, ratten, hamsters en cavia's veroorzaakt SFV encephalitis. Het ziektebeeld is afhankelijk van de leeftijd van het dier, de route van inoculatie en de virulentie van de specifieke SFV stam (2). In Europa wordt SFV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2 (3).

Het genoom van SFV codeert voor een negental functionele eiwitten. Vier eiwitten zijn zogenaamde niet-structurele eiwitten (nsP1, nsP2, nsP3 en nsP4) die betrokken zijn bij de synthese van viraal RNA. Naast deze niet-structurele eiwitten codeert SFV ook voor vier structurele eiwitten, het C-eiwit dat een capsid vormt rond het virale genoom en de eiwitten E1, E2 en E3 die aanwezig zijn in de envelop van het virusdeeltje (4, 5, 6). E1 en E2 zijn beide membraanglycoproteïnen en vormen samen met E3 een heterotrimeer. Het E3 eiwit is hierin met name van belang voor de vorming van dit complex en de translocatie naar het celmembraan (7). Het complex vormt de zogenaamde 'spike' op het virusoppervlak en is verantwoordelijk voor de binding van SFV aan het celmembraan van doelwitcellen. Naast E1, E2 en E3 codeert SFV ook voor een 6 kDa groot eiwit (6K), dat niet wordt ingebouwd in het virusdeeltje.

Botuline Neurotoxine

Botuline Neurotoxines (BoNT's) zijn zeer toxisch en worden geproduceerd door de bacterie *Clostridium botulinum*. BoNT's zijn polypeptides die bestaan uit een lichte (L-chain) en een zware (H-chain) eiwitketen die met elkaar zijn verbonden. De zware keten bindt extracellulair aan de neuronale receptoren van dierlijke cellen en zorgt voor de verplaatsing van het toxine door het plasmamembraan naar het cytosol. De lichte keten bezit een proteasefunctie en knipt afhankelijk van het type BoNT één van de eiwitten synaptobrevin, syntaxin 1A of SNAP-25 (synaptosomal-associated protein) (9). Splitsing van deze eiwitten door BoNT voorkomt dat de zenuwpulsen tussen cellen kunnen worden overgedragen. Het gevolg is dat diverse spieren zullen verslappen en uiteindelijk kan dit de dood tot gevolg hebben(8).

Door de combinatie van de lichte en zware keten zijn BoNT's extreem neurotoxisch ($LD_{50} \sim 0,0011 \mu\text{g/kg}$) en worden in de Regeling GGO ingedeeld in de klasse van T-3 toxines (10). Ook in het advies van de COGEM "Classificatie van toxine producerende genen" wordt BoNT ingedeeld in de hoogste toxiciteitsklasse. Werkzaamheden met dergelijke toxines worden ingeschaald op ML-III inperkingsniveau (11).

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is van plan een replicatiedeficiënte rSFV vector te genereren met een transgen dat codeert voor de lichte keten van BoNT. De vervaardiging van de plasmiden, die nodig zijn voor de productie van deze rSFV vector maakt geen deel uit van de adviesvraag. De kloneringswerkzaamheden met de coderende sequentie voor de lichte keten van BoNT en een SFV helper-plasmide zijn ingeschaald op ML-I inperkingsniveau.

Voor de productie van de rSFV vector wordt het RNA van een tweetal verschillende plasmiden in BHK-21 cellen (Baby Hamster Kidney cellen) getransfecteerd. Het eerste plasmide heet pSFV1 en is verantwoordelijk voor de expressie van de vier niet-structurele 'replicase' eiwitten (nsP1, nsP2, nsP3 en nsP4) (12). Tevens bevat deze vector het 'packagingsignaal'. In dit plasmide wil de aanvrager de coderende sequentie voor de lichte keten van het BoNT kloneren.

Het tweede plasmide, 'pSFV-helper-2' codeert voor de structurele eiwitten E1, Capside (C), p62 (precursor voor E2 en E3) en 6K (12). Aangezien alleen het genomische RNA afkomstig van pSEV1 wordt ingepakt in rSFV-virions codereren de virions niet voor de structurele eiwitten en zijn ze replicatiedeficiënt. Als extra veiligheidsmaatregel is de endoprotease herkenningssite, de aminozuursequentie RHRR in het p62 eiwit veranderd in de sequentie SHQL (13). Hierdoor wordt p62 niet opgesplitst in de eiwitten E2 en E3 en zijn de geproduceerde viruspartikels niet infectieus tenzij ze worden behandeld met chymotrypsine.

Na de productie worden de niet-infectieuze virusdeeltjes eerst geactiveerd door een chymotrypsine behandeling. Vervolgens worden ze gebruikt om primaire zenuwcellen, chromaffine cellen en neuronale cellen van de muis en cellen of weefsels van genetisch gemodificeerde zoogdieren te infecteren. Ongeveer acht uur na de infectie wordt het inoculum verwijderd en worden de cellen gefixeerd met 2,5 % glutaraaldehyde, voordat ze een in ML-I ingeperkte ruimte onder de microscoop worden geanalyseerd. De aanvrager geeft aan dat de vectoren die na activering met chymotrypsine niet worden gebruikt, direct worden geïnactiveerd in een 10% chlooroplossing.

De aanvrager wil de bovengenoemde productie van en handelingen met rSFV virusdeeltjes uitvoeren op ML-II niveau. Het Bureau GGO stelt naast de inschaling op ML-II-niveau, de volgende aanvullende voorschriften voor: open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II uitgevoerd te worden, het dragen van handschoenen is verplicht en besmetting door prik- en/of snij-incidenten dient voorkomen te worden.

Overweging en advies

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over de inschaling van werkzaamheden met een recombinant SFV vector die codeert voor de lichte keten van BoNT.

Het SFV vector systeem

De aanvrager geeft aan voor de productie van de recombinant SFV vector gebruik te maken van het zogenaamde helper-2 systeem dat gebaseerd is op de pSFV1 vector en de pSFV-Helper-2 vector (13). Dit systeem is ontworpen om te voorkomen dat een replicatiecompetent virus ontstaat. Pas na een recombinatie en het herstellen van de gemuteerde endoprotease-knipplaats kan een replicatiecompetent SFV ontstaan. De kans op een dergelijk replicatiecompetent SFV wordt op basis van de beschikbare gegevens geschat op minder dan 10^{-10} (13). In de literatuur is gerapporteerd dat dit systeem niet tot replicatiecompetent SFV heeft geleid (15). De COGEM is derhalve van mening dat de kans op een replicatiecompetent SFV zeer klein is indien gebruik wordt gemaakt van de door de aanvrager beschreven methode om rSFV vectoren te produceren.

De lichte keten van BoNT

In tegenstelling tot het gehele toxine, dat zeer toxisch is, geeft de aanvrager aan dat de lichte keten van BoNT alleen geen toxiciteit heeft. Zonder de zware keten is de lichte keten niet in staat de cel binnen te dringen en zijn neurotoxische effect uit te oefenen. Dit wordt onderbouwd door de studie van Ahmed & Smith die in muizen geen letaliteit vinden na toediening van de lichte keten in een dosis die 45000 keer de letale dosis van BoNT/A overschrijdt (14). De COGEM is hierdoor van mening dat het gebruik van alleen de lichte keten van BoNT niet gelijkgesteld zou moeten worden met het gebruik

van het complete BoNT en zij vindt een inschaling van de lichte keten als T-3 toxine derhalve niet te rechtvaardigen.

De rSFV vector met transgen voor de lichte keten van BoNT

Door de combinatie van de rSFV vector met de coderende sequentie voor de lichte keten van BoNT wordt de lichte keten intracellulair tot expressie gebracht. Hierdoor acht de COGEM het waarschijnlijk dat de lichte keten in de geïnfecteerde cel zijn volledige cytotoxische activiteit zal hebben. De COGEM is daarom van mening dat de mogelijke risico's voor mens en milieu volledig afhangen van de biologische inperking van het te gebruiken SFV vectorsysteem en de mogelijkheid dat een medewerker geïnfecteerd kan worden met deze vectoren.

Volgens de COGEM resulteert de infectie van een medewerker met de niet replicerende rSFV vector hooguit in een lokaal effect binnen de geïnfecteerde cellen. In deze situatie geeft de aanvrager aan dat onafhankelijk van het transgen de cellen die met een replicatiedefectief rSFV zijn geïnfecteerd na 24 uur dood zullen zijn. Er lijkt dus geen verschil te zijn tussen de risico's met rSFV vectoren die al dan niet coderen voor de lichte keten van BoNT.

Een mogelijk hoger risico zou gevormd kunnen worden door een replicatiecompetente rSFV vector met het transgen voor de lichte keten van BoNT. Zoals reeds eerder aangegeven, acht de COGEM de kans op een autonoom replicerend SFV zeer klein. Hierbij is zij tevens van mening dat door de recombinatie die nodig is om een replicatiecompetent virus te genereren het transgen verloren gaat. De kans dat een replicatiecompetent virus tevens codeert voor de lichte keten van BoNT acht de COGEM derhalve verwaarloosbaar klein. Ter preventie van een mogelijke infectie van de medewerker biedt een ML-III inperkingsniveau ten opzichte van een ML-II inperkingsniveau geen extra veiligheid voor de medewerker. Het ML-III inperkingsniveau voorziet met name in extra maatregelen om het vrijkomen van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu te voorkomen. Gezien de beperkte stabiliteit van SFV en de transmissie via muggen acht de COGEM het ML-II inperkingsniveau afdoende om verspreiding in het milieu tegen te gaan. Vanuit dit perspectief ziet de COGEM geen toegevoegde waarde van een inschaling op ML-III inperkingsniveau.

De COGEM merkt hierbij op dat aanvullende werkvoorschriften als gebruik van een veiligheidskabinet klasse II en voorzorgsmaatregelen ter voorkoming van snij- en prikincidenten de risico's voor medewerkers verder zullen beperken. De aanvrager geeft aan dat ongebruikte virusdeeltjes geïnactiveerd zullen worden in een 10% chlooroplossing en dat de cellen worden gefixeerd met 2,5% glutaraaldehyde. De

COGEM acht deze methodes voldoende om de veiligheid voor mens en milieu te waarborgen.

Gezien bovenstaande overwegingen, is de COGEM van mening dat de activiteiten met een rSFV vector die een transgen bevat voor de licht keten van BoNT A, C, of E op ML-II inperkingsniveau kunnen plaatsvinden. Voor het waarborgen van de veiligheid van medewerkers acht zij aanvullende voorschriften noodzakelijk.

Voor de productie van rSFV partikels adviseert de COGEM de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse II;
- De aanwezigheid van de SHQL mutatie in het SFV p62 percursor-eiwit dient geverifieerd te worden in elke batch plasmide die wordt opgegroeid en wordt gebruikt voor de productie van recombinant SFV;
- Het dragen van handschoenen is verplicht;
- Ter voorkoming van besmetting door prik- of snij-incidenten dient de aanvrager maatregelen te treffen, bijvoorbeeld het gebruik van kevlar handschoenen.

Voor de activering van de rSFV partikels met chymotrypsine, de infectie van animale cellen met deze partikels en handelingen met de geïnfecteerde cellen adviseert de COGEM de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse II;
- Het dragen van handschoenen is verplicht;
- Ter voorkoming van besmetting door prik- of snij-incidenten dient de aanvrager maatregelen te treffen, bijvoorbeeld het gebruik van kevlar handschoenen;
- De analyse van geïnfecteerde cellen vindt plaats onder ML-II inperkingsniveau in een gesloten systeem, tenzij de cellen voor de analyse plaatsvindt, worden gefixeerd.

Referenties

1. Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR en Skalka AM (editors) (2004). Principles of Virology. Second edition: 871
2. Knipe DM en Howley PM (editors) (2001). Fields Virology. Fourth edition, vol. 1: 946-948
3. E.C. Council Directive 93/88/EEC (1993)
4. Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR en Skalka AM (editors). (2004) Principles of Virology. Second edition, book page:164 & 165
5. Regenmortel van, MHV *et al.* (editors). (2000) Virus Taxonomy: 879-884
6. Atkins, GJ, Sheahan BJ en Liljeström P. (1999) The molecular pathogenesis of Semliki

- Forest virus: a model virus made useful? *Journal of general virology* 80:2287-2297
7. Lobigs M. (1990) Function of Semliki Forest Virus E3 peptide in virus assembly: Replacement of E3 with an artificial signal peptide abolishes spike heterodimerization and surface expression of E1. *Journal of virology* 64:4346-4355
 8. Kennislink (2003) Neurotoxinen: de natuur vecht terug Internet: www.kennislink.nl/web/show?id=96384. 19 juli 2007
 9. Vadakkanchery V et al. (1999) Proteolysis of SNAP-25 isoforms by botulinum neurotoxin types A, C and E: Domains and amino acid residues controlling the formation of enzyme-substrate complexes and cleavage. *Journal of neurochemistry* 72:327-337
 10. Regeling genetisch gemodificeerde organismen (2004)
 11. COGEM (2005). Classificatie van toxine producerende genen. Advies CGM/050628-01
 12. Ciccarone V. *et al.* Heterologous protein expression in mammalian cells with the SFV gene expression system. *Focus* 16:94-98
 13. Berglund P en Sjöberg M *et al.* (1993). Semliki Forest Virus expression system: Production of conditionally infectious recombinant particles *Bio/Technology* 11:916-920
 14. Ahmed SA en Smith LA (2000). Light chain of Botulinum a neurotoxin expressed as an inclusion body from a synthetic gene is catalytically and functionally active. *Journal of protein chemistry* 19:475-487
 15. Smerdou C en Liljeström P (1999). Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki Forest Virus particles. *Journal of virology* 73: 1092-1098