

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

Aan de Staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening
en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

Uw kenmerk

Uw brief van

Kenmerk

Datum

01-06-2005

CGM/050615-01

15 juni 2005

Onderwerp

Advies ontwerpbeschikking IG 05-035.co1

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van ontwerpbeschikking IG 05-035, betreffende 'Pseudo infectieuze virusdeeltjes', van de Rijksuniversiteit Groningen, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting:

Om op een eenvoudige maar veilige wijze de moleculaire mechanismen van het infectieproces van het Knokkelkoortsvirus (*Denguevirus*; DENV) en het Gele koortsvirus (*Yellow fever virus*; YFV) te kunnen bestuderen, wil de aanvrager gebruik gaan maken van een modelsysteem; het zogeheten 'pseudo infectious particle' (pip) systeem. Bij gebruik van dit systeem worden wel virusdeeltjes gevormd, maar wordt slechts een deel van het erfelijke materiaal van het virus ingepakt. De ontstane pseudo-deeltjes kunnen daardoor maar eenmalig een cel infecteren en missen het vermogen zich te repliceren of verder te verspreiden. De aanvrager maakt gebruik van sterk verzwakte vaccinstammen. De COGEM is verzocht te adviseren over de vervaardiging van pips met behulp van deze stammen en handelingen met cellen die met de pips zijn geïnfecteerd.

De COGEM adviseert handelingen als het opkweken van de replicon- en packaging-plasmiden in *E.coli* en de productie van RNA-transcripten nodig voor de vervaardiging van pips in te schalen op het laagste inperkingsniveau ML-I.

Hoewel het aannemelijk is dat bij gebruik van het pipsysteem geen replicatie-competente virusdeeltjes ontstaan, acht de COGEM, vanwege het ontbreken van verifieerbare gegevens, dit niet voldoende onderbouwd. De COGEM acht daarom de veiligheid van het pipsysteem onvoldoende bewezen om tot omlaagschaling over te gaan. De sterk verzwakte karakters van beide virussen, de beperking tot gebruik in cellijnen en de afwezigheid van de vector maakt dat de COGEM van mening is, in dit specifieke geval, dat indien handelingen met deze virussen worden uitgevoerd op ML-II-niveau, 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,

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

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

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

Pseudo-infectieuze virusdeeltjes; een modelsysteem voor het bestuderen van infectieprocessen van flavivirussen

COGEM advies: CGM/050615-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag betreffende het opzetten en implementeren van een eenvoudig te gebruiken modelsysteem om het infectieproces van het Knokkelkoortsvirus (*Denguevirus*; DENV) en het Gele koortsvirus (*Yellow fever virus*; YFV) in animale cellen te bestuderen.

Hoewel een infectie met het *Denguevirus* in de meeste gevallen niet ernstig is en de symptomen, voornamelijk koorts, na circa zeven dagen verdwijnen, kan infectie uitmonden in hemorragische koorts (DHK) of het dengue shocksyndroom. Dergelijke infecties kunnen de dood tot gevolg hebben (1).

Een aanval van Gele koorts is doorgaans van korte duur. Symptomen zoals koorts en misselijkheid verdwijnen na verscheidene dagen waarna de meeste patiënten zich herstellen. Echter, in een aantal gevallen laait de infectie weer op en neemt de ziekte levensbedreigende vormen aan. Infectie leidt in deze gevallen onder meer tot geelzucht. Voor patiënten in dit stadium zijn de vooruitzichten slecht. De helft van de patiënten komt te overlijden (2).

Om op een eenvoudige maar veilige wijze de moleculaire mechanismen van het infectieproces van flavivirussen als YFV en DENV te kunnen bestuderen, heeft een Amerikaanse onderzoeksgroep voor deze virussen het zogenaamde 'pseudo infectious particle' (pip)-systeem ontwikkeld. Bij gebruik van dit systeem worden wel virusdeeltjes gevormd vergelijkbaar aan wildtype virus, maar wordt slechts een deel van het erfelijke materiaal van het virus ingepakt. De ontstane pseudo-deeltjes kunnen daardoor maar eenmalig een cel infecteren en missen het vermogen zich te repliceren of verder te verspreiden (3).

Flavivirussen

Zowel YFV als DENV behoren tot het genus flavivirussen. Het genus omvat ruim tachtig virussen waarvan het merendeel geassocieerd wordt met humane ziekten. Infecties met flavivirussen worden eveneens aangetroffen in gedomesticeerde dieren (o.a. kalkoen, varken, schaap en hond) en wilde dieren (o.a. ratten en vleermuizen). Vijftig procent van de virussen worden overgedragen door muggen en ruim een kwart door teken. Transmissie van zowel YFV als DENV geschiedt via beten van geïnfecteerde muggen (*Aedes aegyptii*).

Het genoom van flavivirussen bestaat uit een enkelstrengs positieve RNA-streng van circa 11 kb omgeven door nucleocapside en een envelop. Het RNA codeert voor één enkel polyproteïne. Door proteolytische klievingen worden drie structurele eiwitten (C, (pr)M en E) en zeven niet-structurele eiwitten (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B en NS5) gevormd. Het nucleocapside (C) omhult het RNA. De overige twee structurele eiwitten; prM en E vormen samen met het gastheermembraan de envelop. De NS-genen zijn betrokken bij de replicatie van het virus. De genen

coderen voor helicase, polymerase of protease óf zijn betrokken bij het inpakken van het RNA in het virusdeeltje.

Met het ophelderen van de sequentie van beide virussen en de mogelijkheid om volledige lengte (cDNA) klonen van de virale genomen te maken (4,5) kan meer duidelijkheid verkregen worden over het infectieproces. Door het aanbrengen van mutaties en het maken van deleties kunnen functies van genen herleid worden. Deze handelingen blijven, vanwege de hoge pathogeniteit van de virussen, lastig en vereisen strenge veiligheidsmaatregelen. Door het gebruik van het pip-systeem kan met beperktere veiligheidsmaatregelen op een eenvoudige maar toch veilige manier met pathogene flavivirussen worden gewerkt.

Het pip-systeem

Het 'pseudo infectious particle' (pip)-systeem maakt gebruik van twee plasmiden de 'replicon' plasmide en de 'packaging' plasmide. Het repliconplasmide bevat de niet-structurele eiwitten (NS1 –NS5) van het flavivirus en een reporter gen (bijv. het Green Fluorescent protein; GFP). Het packagingplasmide bevat de structurele genen van het betreffende flavivirus (C, prM en E). Deze laatste plasmide is gebaseerd op het alphavirus expressiesysteem. De structurele genen van het alphavirus zijn vervangen door de structurele genen van het flavivirus, waardoor deze onder controle van de subgenomische promotor van het alphavirus komen. De niet-structurele genen van het alphavirus zijn van belang voor de RNA productie.

Na transfectie van de cel met RNA-transcripten van beide plasmiden óf met het replicon-RNA en het packagingplasmide worden alle virale eiwitten van het flavivirus gevormd. De virusdeeltjes die ontstaan zijn op overeenkomstige wijze opgebouwd als het wildtype virus, maar wijken af in de hoeveelheid ingepakt RNA. De aanwezigheid van het inpaksignaal op het replicon-RNA maakt dat enkel het replicon-RNA wordt ingepakt. Deze 'pseudo-deeltjes' worden pips genoemd. Na zuiveren worden nieuwe animale cellen geïnfecteerd met de pips. Doordat het replicon-RNA naast de NS-genen ook een merker gen (bijv. GFP) bevat kan het infectieproces bestudeerd worden. Omdat het RNA coderend voor de structurele eiwitten ontbreekt, zijn pips slechts eenmalig in staat een cel te infecteren.

De adviesvraag

De onderhavige adviesvraag beperkt zich tot het gebruik van de vaccinstammen YFV (stam 17D) en DENV (stam S1). Beide stammen zijn geattenuëerd en worden toegepast als vaccins. YFV en DENV behoren tot pathogeniteitsklasse 3. De hiergenoemde vaccinstammen, worden vanwege hun sterk verzwakte karakter, in het buitenland, waaronder Duitsland en de Verenigde Staten, aangemerkt als pathogeniteitsklasse 2.

De niet-structurele genen (NS1-NS5) van respectievelijk YFV of DENV worden op de repliconplasmiden geplaatst evenals een merker gen (Dsred, EGFP en varianten, LacZ en luciferase). De structurele genen (C, prM en E) van deze virussen en hiervan afgeleide mutante sequenties worden in het packagingplasmide achter de subgenomische promotor van de alphavirussen *Semliki forest virus* (SFV) of het *Sindbis virus* (SIN) geplaatst. Het packagingplasmide kan de sequentie bevatten van

alleen YFV(17D), alleen DENV(S1)-sequentie of een combinatie van beide virale genomen. Hierbij geeft de aanvrager aan dat de structurele genen prM en E altijd afkomstig zullen zijn van hetzelfde virus.

Om grote aantallen te verkrijgen, worden zowel de replicon- als de packagingplasmide in de bacterie *Escherichia coli* (*E. coli*) opgekweekt. Deze plasmiden dienen als uitgangsmateriaal voor RNA-transcriptie of worden in zijn geheel toegevoegd aan de cellen. Transfectie van de animale cellen met DNA (packagingplasmide) en RNA-transcripten (replicon- of packagingplasmide) vindt plaats door middel van elektroporatie. De aanvrager geeft aan met de ontstane pips nieuwe animale of humane cellen te willen infecteren. Waarna met behulp van (fluorescentie)-microscopie, FACS of luminometer de expressie van het merkereiwit wordt bestudeerd.

Inschalingsvoorstel

Het inschalingsvoorstel van Bureau GGO betreffende voornoemde werkzaamheden met het pip-systeem zijn gebaseerd op de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (6). Bureau GGO stelt de volgende inschalingsniveaus voor. Het opkweken van de plasmiden in *E. coli* en de vervaardiging van zowel het replicon- als de packagingplasmide en RNA-transcripten worden uitgevoerd op ML-I. Transfectie van animale cellen met RNA-transcripten of DNA (=vervaardiging van pips), handelingen met deze getransfecteerde cellen, infectie van de animale cellen met pips en handelingen met deze cellen moeten worden uitgevoerd op ML-II. De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met deze inschaling.

Overweging en advies

In onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van het pip-systeem om de moleculaire mechanismen van het infectieproces van de vaccinstammen YFV(17D) en DENV(S1) te kunnen bestuderen.

Zowel in de replicon- als de packagingplasmiden worden slechts delen van de virale genomen van YFV(17D) of DENV(S1) ingebracht. Hierbij liggen de structurele genen en de niet-structurele genen niet op dezelfde plasmide. RNA-transcripten afgeleid van deze plasmiden zijn derhalve niet infectieus. De COGEM is van mening dat de aanwezigheid van de niet-structurele genen van de alphavirussen SIN en SFV in de packagingplasmiden hierin geen verandering brengt. Transcriptie van deze genen zal niet leiden tot functioneel recombinant RNA. De COGEM adviseert derhalve handelingen als het opkweken van de replicon- en packagingplasmiden in *E.coli* en de productie van RNA-transcripten, conform het voorstel van Bureau GGO, in te schalen op inperkingsniveau ML-I.

De aanvrager geeft aan cellen te willen transfecteren met RNA-transcripten van beide plasmiden of met RNA-transcripten van het repliconplasmide in combinatie met packagingplasmiden (=DNA).

De packagingplasmiden bevatten de structurele genen van het flavivirus en de subgenomische promotor en de niet-structurele genen van de alphavirussen SFV of SIN. De structurele genen van DENV(S1) of YFV(17D) en hiervan afgeleide mutante sequenties zijn hierbij achter de subgenomische promotor van het betreffende

alphavirus geplaatst. Hoewel niet uit te sluiten valt dat de aanwezigheid van de niet-structurele genen van het alphavirus effect kan hebben op de replicatie van het replicon-RNA is de COGEM van mening dat er geen redenen zijn om aan te nemen dat de niet-structurele genen van SFV en SIN een rol spelen bij het inpakken van het RNA óf dat viraal RNA afkomstig van het packagingplasmide ingepakt zal worden in de pips.

Theoretisch gezien zal slechts het replicon-RNA ingebouwd worden in de pips. Hierdoor kunnen geen replicatiecompetente deeltjes ontstaan. De aanvrager onderbouwt deze stelling met de resultaten van een risicoanalyse uitgevoerd door de Amerikaanse onderzoeksgroep waarvan zij de plasmiden betrekken. De aanvrager levert echter geen resultaten aan van deze analyse, maar beperkt zich tot de volgende omschrijving van de uitgevoerde experimenten en behaalde resultaten. De geogste pips zijn meerdere malen gepasseerd over cellen. Na elke passage is met behulp van RT-PCR of immunofluorescentie de expressie van zowel de structurele als de niet-structurele genen en eiwitten bepaald. Na infectie van de cellen met pips is de expressie van niet-structurele genen en eiwitten aangetoond. Expressie van de structurele genen werd niet waargenomen. Bij de daarop volgende passage werd geen expressie meer waargenomen van zowel de niet-structurele als de structurele genen.

Hoewel het aannemelijk is dat bij gebruik van het pip-systeem geen replicatiecompetente virusdeeltjes ontstaan, acht de COGEM, vanwege het niet aanleveren van verifieerbare gegevens, dit niet voldoende onderbouwd. Aangezien het een relatief nieuw systeem betreft, pleit de COGEM voor een zo groot mogelijke transparantie betreffende gegevens over het eventueel voorkomen van replicatiecompetente deeltjes. In dit stadium is nog onvoldoende aangetoond dat recombinatie niet optreedt. Ook is onduidelijk in hoeverre door aangebrachte mutaties of accumulaties van spontane mutaties het packaging-RNA een (pseudo) inpaksignaal kan verwerven, waardoor ook dit RNA ingepakt kan worden en er replicatiecompetente deeltjes ontstaan.

Daarbij geeft de aanvrager aan dat het repliconRNA naast de NS-genen ook een deel van het capsidgen (de enhancersequentie) kan bevatten. Fragmenten van het virale genoom kunnen hierdoor zowel op het packaging- als het repliconRNA liggen, wat de theoretische kans op recombinatie verhoogt. Dat recombinatie tot een functioneel infectieus virusdeeltje leidt, is niet waarschijnlijk. De door de aanvrager aangeleverde plasmidekaartjes brengen hierin echter geen verheldering.

De COGEM acht derhalve de veiligheid van het pip-systeem onvoldoende bewezen om, op basis van het te gebruiken systeem, tot omlaagschaling over te gaan.

De aanvraag behelst het gebruik van de sterk geattenueerde vaccinstammen YFV(D17) en het DENV(S1). Gezien de aard van de uitgangsstammen acht de COGEM het aannemelijk dat eventuele door recombinatie ontstane replicatiecompetente virusdeeltjes een pathogeniteit vergelijkbaar aan of minder dan de gebruikte vaccinstam bezitten. Zij acht het eveneens aannemelijk dat een eventueel chimaer replicatiecompetent virusdeeltje geen verhoogde pathogeniteit heeft ten opzichte van de oorspronkelijke vaccinstammen DENV en YFV. De aanvrager geeft aan dat prM en de E eiwitten altijd afkomstig zullen zijn van of YFV of DENV.

Alleen het nucleocapside (C) eiwit zal van andere herkomst zijn. Hierdoor worden er geen chimere eiwitten gevormd op het oppervlak van het virusdeeltje.

Daarnaast geeft de aanvrager aan uitsluitend gebruik te maken van cellijnen. Bovendien betreft het hier virussen die in Nederland van nature niet voorkomen vanwege de afwezigheid van de vector van deze virussen; de mug *Aedes aegyptii*.

De sterk geattenueerde karakters van beide virussen, de beperking tot gebruik in cellijnen en de afwezigheid van de vector maakt dat de COGEM van mening is dat indien handelingen met deze virussen worden uitgevoerd op ML-II-niveau, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Concluderend is de COGEM, in dit specifieke geval, van mening dat bij het gebruik van het pip-systeem, in combinatie met het gebruik van sterk geattenueerde vaccinstammen op ML-II niveau, de veiligheid voor mens en milieu gewaarborgd is.

De COGEM adviseert een aanvullend voorschrift op te nemen waarin gesteld wordt dat de te gebruiken cellen vrij moeten zijn van flavivirussen. Om de kans op recombinatie verder te minimaliseren is het tevens niet toegestaan de handelingen met de getransduceerde cellen uit te voeren in een tijdsbestek van minder dan 30 minuten nadat handelingen met een andere flavivirus anders dan de voornoemde vaccinstammenweek in hetzelfde veiligheidskabinet hebben plaatsgevonden.

Referenties

1. Gele Koorts; informatie over oorzaak, symptomen, verspreiding etc. op www.czmedicinfol.nl
2. Dengue (Knokkelkoorts); informatie over oorzaak, symptomen, verspreiding etc. op www.czmedicinfol.nl
3. Jones CT, Patkar CG and Kuhn RJ, 2005. Construction and applications of yellow fever virus replicons. *Virology* 331: 247-259.
4. Bredenbeek PJ, Kooi EA, Lindenbach B, Huijckman N, Rice CM and Spaan WJM, 2003. A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication *Journal of General Virology* 84: 1261-1268.
5. Kinney RM, Butrapet S, Chang GJ, Tsuchiya KR, Roehrig JT, Bhamarapravati N, Gubler DJ, 1997. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology* 230(2):300-308.
6. Regeling Genetisch gemodificeerde organismen en de richtlijnen van de COGEM bij deze regeling; juni 1998. Uitgave van het Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijk ordening en Milieubeheer (VROM)