

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 22 juli 2020
KENMERK CGM/200722-01
ONDERWERP Advies omlaagschaling werkzaamheden met gg-VSIV

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,


Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 20-132_2.8-000 getiteld: 'Omlaagschaling van werkzaamheden met een geattenueerde stam van Vesicular stomatitis virus' ingediend door het Leiden Universitair Medisch Centrum (LUMC), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd (gg-) vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV) dat een deletie bevat in het zogenaamde Matrix (M)-eiwit en het gen bevat dat codeert voor het 'green fluorescent protein' (GFP). De aanvrager verzoekt werkzaamheden met dit gg-virus (VSVΔM51) in combinatie met cellijnen en dieren op ML-II en DM-II niveau uit te voeren.

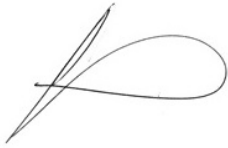
Wildtype VSIV veroorzaakt een ziekte in vee met symptomen die lijken op mond- en klauwzeer. De COGEM heeft VSIV als een klasse 3 pathogeen geclassificeerd.

Op basis van resultaten uit verschillende studies met cellijnen en diermodellen acht de COGEM het aannemelijk dat VSVΔM51 voldoende geattenueerd is ten opzichte van het wildtype VSIV om omlaagschaling van de voorgenomen werkzaamheden van inperkingsniveau III naar II (ML-II en DM-II niveau) te rechtvaardigen. Om te voorkomen dat laboratoriummedewerkers besmet raken met VSVΔM51 en om eventuele verspreiding en uitsleep van VSVΔM51 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. - Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
DG Milieu en Internationaal

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM lid prof. dr. R.C. Hoeben niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies

Omlaagschaling van *in vitro*, *in vivo* en *ex vivo* werkzaamheden met gg-vesicular stomatitis Indiana virus (VSVΔM51)

COGEM advies CGM/200722-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van *in vitro*, *in vivo* en *ex vivo* werkzaamheden met een genetisch gemodificeerde (gg-)variant van het vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV) van ML-III naar ML-II (IG 20-132). Deze gg-VSIV, VSV Mdelta51-GFP of VSVΔM51 genoemd, bevat een codon-deletie in het gen dat codeert voor het matrix (M) eiwit, waardoor een aminozuur ontbreekt, en bevat daarnaast het gen dat codeert voor het 'green fluorescent protein' (GFP). De aanvrager stelt dat VSVΔM51 geattenuëerd is ten opzichte van wildtype VSIV en verzoekt onderzoek naar de oncolytische eigenschappen van dit gg-virus op een lager inperkingsniveau (ML-II en DM-II) uit te voeren, onder inachtneming van enkele aanvullende werkvoorschriften.

2. 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 is besmettelijk, wordt gekenmerkt door blaasjes op de tong, het tandvlees, de uiers en de hoeven van de dieren, en lijkt sterk op mond-en-klauwzeer.^{3,4} Vesiculaire stomatitis wordt door de Wereldorganisatie voor diergezondheid (OIE) niet meer als meldingsplichtige dierziekte gekenmerkt, maar is in Nederland nog wel aangifteplichtig.^{5,6,7} 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.^{3,4,8}

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 In zeer uitzonderlijke gevallen kan encefalitis optreden na infectie met VSIV.⁹ Verspreiding tussen mensen onderling is niet gerapporteerd.¹⁰

VSIV is een 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, remming van

de genexpressie van de gastheer, virus 'budding' en apoptose (geprogrammeerde celdood).^{4,11,12} 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

3. Voorgenomen werkzaamheden met VSVΔM51

De gg-VSIV stam die in deze vergunningaanvraag gebruikt zal worden is VSVΔM51, die elders geproduceerd is en verkregen is van derden. VSVΔM51 bevat een codon-deletie in het gen dat codeert voor het M-eiwit, dat resulteert in de deletie van methionine 51, en bevat daarnaast een extra cistron dat codeert voor GFP, dat geïnsereerd is tussen de G en L sequenties van VSIV.^{13,14}

De aanvrager is voornemens tumorcellijnen te infecteren met VSVΔM51 om het oncolytische effect te bestuderen. Ook worden dierexperimenten uitgevoerd, waarbij wildtype en gg-muizen eerst worden geïnjecteerd met cellen die tumoren vormen, gevolgd door injectie met VSVΔM51. Hiermee wordt het effect van VSVΔM51 op tumorgroei *in vivo* onderzocht. Vervolgens worden cellen en weefsels afgenomen van de geïnfecteerde dieren die verder worden onderzocht.

De aanvrager is van mening dat VSVΔM51 een veel mildere variant is ten opzichte van wildtype VSV en verzoekt de voorgenomen werkzaamheden op ML-II en DM-II uit te mogen voeren, waarbij de aanvullende voorschriften die gelden voor VSIV in acht zullen worden genomen. De infectieroute van VSIV in acht nemende, houdt dit in dat op ML-II de standaard aanvullende voorschriften voor virussen die infectieus zijn via wondjes van de huid dan wel zich aerogeen/via fomites kunnen verspreiden, zullen worden gehanteerd. Dit zijn:

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

Voor handelingen op DM-II gelden voor activiteiten met kleine zoogdieren in associatie met gg-virussen de volgende voorschriften:

- De dieren zijn gehuisvest in filtertopkooien;
- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen (*i.v.m., verspreiding VSIV via wondjes in de huid*);
- Open handelingen, waaronder alle handelingen waarbij een besmette filtertopkooi geopend wordt, worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd.

4. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft VSIV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.¹⁵ De COGEM heeft meerdere malen geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met G-eiwit gedeleteerde VSIV (VSIVΔG) chimere met gensequenties van heterologe oppervlakte-eiwitten,^{e.g.,16,17,18} of VSIVΔG gepseudotyperd met heterologe oppervlakte-eiwitten.¹⁹ Zij heeft niet eerder advies uitgebracht over de inschaling van werkzaamheden met een gg-VSIV deletiemutant waarbij een deletie of mutatie in het M-eiwit is aangebracht, of geen heterologe gensequenties voor oppervlakte-eiwitten uitgewisseld zijn.

5. Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met gg-VSIV, VSVΔM51. De aanvrager is van mening dat VSVΔM51 voldoende geattenuëerd is ten opzichte van wildtype VSIV om een inschaling op ML-II en DM-II niveau te rechtvaardigen. Ter onderbouwing hiervoor verwijst hij naar verschillende *in vitro* en *in vivo* studies met VSVΔM51 of andere VSIV varianten met mutaties in het M-eiwit.

Vanwege de gevoeligheid van VSIV voor de interferon (IFN) gemedieerde antivirale respons van een gezonde gastheercel, en het feit dat in veel tumorcellen de IFN respons vaak verstoord is waardoor deze cellen vatbaarder zijn voor productieve infectie, wordt veel onderzoek gedaan naar VSIV-varianten voor gebruik als oncolytische therapie.²⁰ De meeste wildtype VSIV stammen kunnen bij infectie een remmende werking hebben op de IFN respons van de gastheercel. Verondersteld wordt dat het M-eiwit hierbij een rol speelt door het blokkeren van het nucleaire transport van interferon-beta mRNA naar het cytoplasma.^{12,13,14,21,22} Uit onderzoek is gebleken dat VSIV varianten die mutaties hebben in het gen dat codeert voor het M-eiwit (een wijziging of deletie van het aminozuur op positie 51 van het eiwit), een sterke IFN respons kunnen opwekken.^{14,23,24} Dit maakt gezonde cellen beter resistent tegen infectie met deze varianten.^{24,25} Mutaties in het M-eiwit gen hebben geen effect op de assemblage van het virusdeeltje, VSVΔM51 is daarom replicatie-competent. Ook heeft de mutatie in het M-eiwit gen geen invloed op de mogelijkheid tot het induceren van apoptose (oncolytische eigenschap).^{24,26}

Onderzoek naar de veiligheid en effectiviteit van VSVΔM51 in gecultiveerde glioomcellen verkregen van patiënten met hersentumoren, glioomcellijnen, en in een muismodel waarbij glioom geïnduceerd is (subcutaan of intracerebraal), toont aan dat glioomcellijnen en klinische monsters gevoelig zijn voor infectie met VSVΔM51 en er een cytopathisch effect optreedt. In niet-maligne cellijnen werd geen celdood waargenomen. Intra-tumor injectie van VSVΔM51 in het muismodel zorgde voor een afname in subcutane tumorgroei. Bij intraveneuze toediening in muismodellen met uni- of bilaterale hersentumoren bleven de dieren gemiddeld langer leven dan bij inoculatie met ‘dood’ virus (behandeld met ultraviolet licht). Productieve infectie van VSVΔM51 werd waargenomen in de tumorcellen van de muizen, maar niet in andere gezonde weefsels.¹³

Intraveneuze toediening van VSVΔM51 werd goed getolereerd, ook in hoge doseringen; bij doseringen van $\leq 1 \times 10^9$ PFU werd geen sterfte waargenomen in de 60 dagen dat de muizen gemonitord werden, bij de hoogste dosering van 5×10^9 PFU was 50% van de muizen nog in leven na 60 dagen. Wanneer VSVΔM51 intracerebraal werd toegediend, bleek dit lethaal, zelfs bij lagere doseringen van 5×10^2 plaque-vormende eenheden (PFU). Hierbij is ook gekeken of er reversie naar wildtype is opgetreden, maar dat was niet het geval.¹³

In andere studies naar de veiligheid en effectiviteit van VSVΔM51 of VSV-M51R (methionine → arginine substitutie) is bij intratumor of intraveneuze toediening geen (nefro)toxiciteit of neurovirulentie waargenomen.^{20,23,27} In hersenweefsel van met VSVΔM51 geïnfecteerde dieren is geen gg-virus aangetroffen.²⁰ Bij intranasale inoculatie met VSV-M51R bleek deze variant minder pathogeen dan wildtype VSV.²⁶

De COGEM is van oordeel dat de door de aanvrager aangeleverde gegevens van *in vitro* studies met VSV Δ M51 (en het vergelijkbare VSVM51R) laten zien dat VSV Δ M51 geattenuerd is door een hogere IFN-inductie. *In vivo* studies bij muizen laten zien dat VSV Δ M51 een verminderde neurovirulentie heeft en verminderd pathogeen is ten opzichte van wildtype VSIV.^{13,14,20,24}

De COGEM wijst erop dat de codon-deletie in VSV Δ M51 door recombinatie met wildtype VSIV hersteld kan worden. Om het risico van recombinatie te minimaliseren, adviseert de COGEM dat gelijktijdige aanwezigheid van wildtype VSIV (of verwante vesiculovirussen) in de cellijnen of dieren uitgesloten moet worden.

Rhabdovirussen, waartoe VSIV behoort, kennen een grote diversiteit en genomische plasticiteit, mede dankzij de hoge mutatie-frequentie tijdens de genoomrePLICATIE met een fout-gevoelig RNA-polymerase.²⁸ De COGEM acht de kans op spontane reversie van de codon-deletie zeer klein, maar theoretisch niet geheel uit te sluiten. Ook acht zij het theoretisch mogelijk dat er spontaan mutaties op kunnen treden die het defect mogelijk (gedeeltelijk) kunnen compenseren. Mogelijk draagt de aanwezigheid van het GFP-gen in het virusgenoom nog wel bij aan attenuatie.

De COGEM wijst erop 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 VSV Δ M51 te minimaliseren, en de impact van mogelijke consequenties te voorkomen.

5.1 Conclusie

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat VSV Δ M51 geattenuerd is ten opzichte van wildtype VSIV. Het optreden van herstel van de deletie of compensatie door spontane mutatie kan niet volledig uitgesloten worden. Echter, met inachtneming van de voorgestelde aanvullende voorschriften acht de COGEM de omlaagschaling van de werkzaamheden van inperkingsniveau III naar ML-II en DM-II niveau gerechtvaardigd. De combinatie van de zeer kleine kans op reversie en het hanteren van de geadviseerde aanvullende maatregelen die de kans op besmetting van de medewerker en uitsleep naar het milieu (bijvoorbeeld landbouwhuisdieren) minimaliseren, resulteert in een verwaarloosbaar kleine kans op verspreiding in het milieu.

Samengevat adviseert de COGEM de volgende aanvullende voorschriften te hanteren op ML-II:

- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen;
- Open handelingen worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet van klasse II;
- De te gebruiken cell(ijn)en zijn vrij van wildtype VSIV of verwante virussen;
- Laboratoriummedewerkers mogen geen contact hebben met varkens, grote en kleine herkauwers en paarden tot 3 dagen na het werken met VSV Δ M51.

Voor handelingen op DM-II adviseert de COGEM de volgende voorschriften:

- De dieren zijn gehuisvest in filtertopkooien;
- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen (*i.v.m., verspreiding VSIV via wondjes in de huid*);
- Open handelingen, waaronder alle handelingen waarbij een besmette filtertopkooi geopend wordt, worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- De te gebruiken dieren zijn vrij van wildtype VSIV of verwante virussen;
- Laboratoriummedewerkers mogen geen contact hebben met varkens, grote en kleine herkauwers en paarden tot 3 dagen na het werken met VSVΔM51.

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.

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: 13 juli 2020)
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. World Organisation for Animal Health (OIE). OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2020. <https://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/> (bezoekt: 15 juli 2020)
6. Wettenbank. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0018397> (bezoekt: 13 juli 2020)
7. Nederlandse Voedsel- en Waren Autoriteit. www.nvwa.nl/onderwerpen/dierziekten/lijt-aangifteplichtige-dierziekten/aangifteplichtige-dierziekten-bij-vee (bezoekt: 13 juli 2020)
8. Rozo-Lopez P *et al.* (2018). Vesicular stomatitis virus transmission: A comparison of incriminated vectors. *Insects* 9: 190
9. Quiroz E *et al.* (1988). A human case of encephalitis associated with vesicular stomatitis virus (Indiana serotype) infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39: 312-314
10. 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: 13 juli 2020)
11. Ahmed M *et al.* (2003). Ability of the matrix protein of vesicular stomatitis virus to suppress beta interferon gene expression is genetically correlated with the inhibition of host RNA and protein synthesis. *J. Virol.* 77: 4646-4657
12. von Kobbe C *et al.* (2000). Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell gene expression by targeting the nucleoporin Nup98. *Mol. Cell* 6: 1243-1252

13. Lun X *et al.* (2006). Effects of intravenously administered recombinant vesicular stomatitis virus (VSV(deltaM51) on multifocal and invasive gliomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 98: 1546-1557
14. Stodjl DF *et al.* (2003). VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 4: 263-275
15. COGEM (2011). Classificatie van Vesicular stomatitis virus en inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde VSV deeltjes. COGEM advies CGM/110815-03
16. COGEM (2016). Inschaling werkzaamheden met HIV-Env gepseudotypeerd gg-Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV).COGEM advies CGM/161221-01
17. COGEM (2016). Omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) Vesicular stomatitis Indiana virus. COGEM advies CGM/160310-01
18. COGEM (2018). Inschaling van werkzaamheden met Vesicular stomatitis Indiana virus voorzien van het oppervlakte-eiwit van Lassa virus. COGEM advies CGM/181025-01
19. COGEM (2016). Omlaagschaling van werkzaamheden met gepseudotypeerd, 'single-round' genetisch gemodificeerd Vesicular stomatitis Indiana virus. COGEM advies CGM/160502-04
20. Murphy AM *et al.* (2012). Vesicular Stomatitis Virus as an Oncolytic Agent against Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Virol.* 86: 3073-3087
21. Petersen JM *et al.* (2000). The Matrix protein of Vesicular stomatitis virus inhibits nucleocytoplasmic transport when it is in the nucleus and associated with nuclear pore complexes. *Mol. Cell. Biol.* 20: 8590-8601
22. Quan B *et al.* (2014). Vesiculoviral matrix (M) protein occupies nucleic acid binding site at nucleoporin pair (Rae1•Nup98). *PNAS* 111: 9127-9132
23. Ebert O *et al.* (2005). Systemic therapy of experimental breast cancer metastases by mutant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Cancer Gene Ther.* 12: 350-358
24. Wollmann G *et al.* (2010). Some attenuated variants of Vesicular stomatitis virus show enhanced oncolytic activity against human glioblastoma cells relative to normal brain cells. *J. Virol.* 84: 1563-1573
25. Muscolini M *et al.* (2019). SIRT1 Modulates the sensitivity of prostate cancer cells to vesicular stomatitis virus oncolysis. *J. Virol.* 93: e00626-19
26. Ahmed M *et al.* (2004). Sensitivity of prostate tumors to wild type and M protein mutant vesicular stomatitis viruses. *Virology* 330: 34-49
27. Ahmed M *et al.* (2008). Immune Response in the Absence of Neurovirulence in Mice Infected with M Protein Mutant Vesicular Stomatitis Virus. *J Virol.* 82: 9273–9277
28. Walker PJ *et al.* (2015). Evolution of genome size and complexity in the *Rhabdoviridae*. *PLoS Pathog.* 11: e1004664