

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

DATUM 03 juli 2019
KENMERK CGM/190703-03
ONDERWERP Advies classificatie Pichindé virus en inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerde replicatie(in)competent virus

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier 'Generatie replicatie deficiënte en competente arenavirus vaccine vectoren' (IG 19-107_2.8-000), ingediend door Batavia Biosciences B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van *Cali mammarenavirus* (PICHV), voorheen bekend als het Pichinde virus. Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) replicatie(in)competente PICHV virusdeeltjes die afgeleid zijn van de cavia geadapteerde stam P18.

PICHV komt voor bij bepaalde knaagdieren in Amerika. Bij mensen zijn antistoffen tegen het virus aangetroffen, maar nooit ziekteverschijnselen beschreven. De COGEM adviseert het virus in te delen in pathogeniteitsklasse 2, en de voorgenomen productie van en activiteiten met gg-rcPICHV P18 op ML-II inperkingsniveau en met gg-r-incPICHV P18 op ML-I inperkingsniveau uit te voeren.

Onder in acht neming van deze inperkingsniveaus acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein.

Het kan niet geheel uitgesloten worden dat gg-PICHV onder laboratoriumomstandigheden de mens kan infecteren, verdere verspreiding kan echter niet optreden. De COGEM signaleert daarom dat vanuit ARBO-overwegingen tijdens de werkzaamheden aanvullende veiligheidsmaatregelen genomen moet worden.



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
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

Classificatie *Cali mammarenavirus* (PICHV) en inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd replicatiecompetent en replicatie-incompetent PICHV

COGEM advies CGM/190703-03

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie van het *Cali mammarenavirus* (PICHV), voorheen bekend als Pichinde of Pichindé virus (PICV). Tevens is de COGEM gevraagd of PICHV aangemerkt kan worden als strikt dierpathogeen, en is zij gevraagd te adviseren over de inschaling van activiteiten met replicatiecompetent en replicatie-incompetent PICHV P18. PICHV P18 is een aan cavia's geadapteerd virus dat bij deze dieren een aan Lassakoorts gelijkend ziektebeeld veroorzaakt. Het PICHV P18 cavia diermodel wordt daarom voor Lassakoorts studies gebruikt. De vergunningaanvraag (IG 19-107) is ingediend door Batavia Biosciences B.V. De aanvrager wil het genetisch gemodificeerde (gg-) virus gaan gebruiken als platform voor de productie van gg-vaccins.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in oenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

- a) het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant;
- b) het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
- c) het micro-organisme behoort tot een soort die vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie;
- d) van het micro-organisme is het niet-virulente karakter door middel van adequate tests aangetoond.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie

verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 3 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 4 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

2.1 Strikt dierpathogene virussen

In 2014 heeft de COGEM in een advies beschreven aan welke criteria een virus moet voldoen om als strikt dierpathogeen virus aangemerkt te worden.¹ De definitie die zij hiervoor hanteert, luidt als volgt: Een strikt dierpathogeen virus is een virus met een dier als primaire gastheer waarbij infectie, al dan niet gevolgd door ziekte, bij de mens nooit is waargenomen, tenzij onder uitzonderlijke omstandigheden.

De overweging die de COGEM hanteert om dierpathogenen te classificeren wijkt op enkele punten af van die van humaanpathogenen. In 2014 heeft de COGEM in een signalering inzicht geboden in haar overweging bij de classificatie van dierpathogene micro-organismen, en aangegeven welke aspecten een rol spelen in haar oordeel.² De classificatie van dierpathogene micro-organismen is gebaseerd op vier elementen:

- a) het ziekmakende potentieel,
- b) de enzoötische aanwezigheid,
- c) het verspreidingspotentieel van het betreffende micro-organisme,
- d) de mogelijkheden om verspreiding in te perken.

Deze elementen belichten specifieke kenmerken van het betreffende micro-organisme en vormen ieder een onderdeel van de totale classificatie. De COGEM benadrukt hierbij dat geen van de elementen afzonderlijk een doorslaggevende rol heeft, maar altijd in samenhang met elkaar tot een classificatie leidt.

3. Cali mammarenavirus (PICHV)

PICHV behoort tot de familie *Arenaviridae*, genus *Mammarenavirus*.³ Het virus is in 1971 voor het eerst beschreven en vernoemd naar Pichindé, een regio in de buurt van de plaats Cali in Colombia.^{4,5} Het is een enkelstrengs gesegmenteerd 'ambisense' RNA-virus dat met een lipidenmembraan wordt omhuld.³ In het membraan zijn glycoproteïnen (GP) verankerd. De RNA-segmenten worden door een nucleocapsid (NP) eiwit omhuld.

3.1 Genomische organisatie van PICHV

Het genoom van PICHV bestaat uit twee RNA segmenten: het L (large) segment en het S (small) segment. Op het L segment bevindt zich aan het 5'-uiteinde in de sense oriëntatie het Z gen, dat codeert voor matrixeiwit Z. Aan het 3'-uiteinde bevindt zich in de antisense oriëntatie het L gen, dat codeert voor het RNA polymerase. Op het S-segment bevindt zich aan het 5'-uiteinde in de sense oriëntatie het glycoproteïne 'precursor' (GPC) gen. Na translatie wordt het GPC gekliefd in de GP1 en GP2 eiwitten. Aan het 3'- uiteinde bevindt zich in de antisense oriëntatie het NP gen, dat codeert voor het nucleocapside.³

3.2 Eigenschappen van PICHV

De primaire gastheer van PICHV is de rijstrat (*Oryzomys albigularis*).^{5,6} Dit knaagdier komt voor in Noord-, Midden- en Zuid-Amerika. Ook bij andere in Noord-Amerika voorkomende knaagdieren, behorende tot het geslacht *Neotoma*, zijn antistoffen tegen het virus aangetoond.⁷ *In vivo* studies bij ingeteelde cavia's hebben aangetoond dat het virus milde tot ernstige ziekteverschijnselen bij deze dieren kan veroorzaken.⁶

Bij mensen zijn antistoffen tegen het virus aangetroffen, maar nooit ziekteverschijnselen beschreven.^{5,8} In een gebied waar PICHV enzoötisch was, werden bij twee van de 82 personen die waren onderzocht, antistoffen tegen PICHV aangetoond.⁵ Onderzoek bij mensen die beroepshalve met grote hoeveelheden virus in aanraking zijn gekomen, toonden eveneens antilichamen tegen het virus (6 van 13 medewerkers) aan, zonder dat deze medewerkers duidelijke ziekteverschijnselen vertoonden.⁹ Eén van de medewerkers ontwikkelde aan een hand een blaasjesachtige wond, wat wijst op de mogelijke 'porte d'entrée' van het virus. Er zijn geen aanwijzingen dat er overdracht van PICHV tussen mensen onderling plaatsvindt.

Onderzoek naar alle thans bekende voor de mens pathogene arenavirussen (*Argentinian mammarenavirus virus* (Junin virus; JUNV), *Brazilian mammarenavirus virus* (Sabiá virus, SBAV), *Chapare mammarenavirus virus* (CHAPV), *Guanarito mammarenavirus virus* (GTOV), *Lassa mammarenavirus virus* (LASV), *Lujo mammarenavirus virus* (LUJV), *Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus virus* (LCMV), *Machupo mammarenavirus virus* (MACV) en Dandenong virus), heeft aangetoond dat interactie tussen de zogenaamde RIG-I-like receptor (RLR) en het Z-eiwit een essentiële rol speelt bij de pathogenese voor de mens. Deze RLR/Z-eiwit interactie wordt bij een infectie met humaan pathogene arenavirussen geremd, waardoor remming optreedt van de interferon respons in primaire macrofagen, en replicatie van het virus toeneemt. Het Z-eiwit van arenavirussen die niet pathogeen zijn voor de mens, zoals PICHV en het *Tacaribe mammarenavirus* (TCRV), blijkt aan de N-terminus van het eiwit een andere samenstelling te hebben. Hierdoor wordt de RLR-afhankelijke interferonproductie niet geremd, en zijn deze arenavirussen niet in staat de aangeboren immuunrespons bij de mens te onderdrukken.¹⁰

De Z-eiwit gemedieerde remming van interferonproductie door de humaan pathogene arenavirussen kan niet aan specifieke aminozuurverschillen in het N-terminale uiteinde toegeschreven worden. Het exacte moleculaire mechanisme wat hier aan ten grondslag ligt is op dit moment nog niet opgehelderd.¹⁰

3.3 PICHV P18

Virusstam PICHV P18 is verkregen door PICHV stam An4763 18 keer serieel te passeren in de milt van ingeteelde cavia's.^{6,11,12,13} Het P18 virus is aan deze dieren geadapteerd en veroorzaakt bij cavia's een aan Lassakoorts gelijkend ziektebeeld met een fatale afloop.^{12,13} Het ziektebeeld kenmerkt zich door koorts en gaat gepaard met bloedingen (virale hemorrhagische koorts).

Een voorloperstam van stam An4763 die twee seriële miltpassages in cavia's heeft ondergaan (P2), vertoont een mild ziekteverloop bij niet-ingeteelde cavia's.^{11,12} Vergelijkende sequentie-analyses van PICHV P2 en PICHV P18 hebben laten zien dat de toename in pathogeniteit van P18 niet kon worden toegeschreven aan veranderingen in de aminozuursamenstelling van het Z-eiwit (L-segment), aangezien deze samenstelling voor stam P2 en P18 identiek is.¹¹ Wel lieten vergelijkende sequentie-analyses zien dat mutaties in de L- en GP-coderende genen tot aminozuurwijzigingen leidden en hebben bijgedragen aan de toename in pathogeniteit van P18. Mutaties in het L eiwit (RNA-polymerase, L-segment) droegen bij aan een hogere virale replicatie. Mutaties in het GP eiwit (S-segment) droegen bij aan een efficiëntere infectie van de cel en daardoor aan een toename in de virulentie.^{11,12}

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil met behulp van 'reverse genetics' replicatie-incompetent (r-inc) en replicatiecompetent (rc) gg-PICHV genereren. Het gg-virus is afgeleid van stam P18. Daartoe zal hij gebruik maken van een platform met respectievelijk vier plasmiden en vijf plasmiden. Het onderscheid tussen deze twee systemen wordt onder 4.1 en 4.2 nader toegelicht.

In het genoom van het virus zullen transgene sequenties worden ingebracht. Deze sequenties zijn afkomstig van het *Hepatitis B virus* (HBV), Humaan cytomegalovirus (hCMV), Human immunodeficiency virus (HIV), de mens (korte signaal sequenties), en *Aequorea victoria* (markergenen).

De eerste productiestap ('rescue') van de gg-virusdeeltjes vindt plaats door een aangepaste HEK293 cellijn door middel van electroporatie met de plasmiden te transfecteren. Deze aangepaste cellijn brengt *in trans* het GP van LCMV stam WE in plaats van het autologe GP tot expressie (HEK293-GP^{WE}). De aanvrager geeft aan dat rescue van de rcPICHV P18 deeltjes om praktische redenen in de HEK293-GP^{WE} cellijn plaatsvindt, omdat de rescue-procedure op deze cellen is geoptimaliseerd. Vervolgproductiestappen van en overige activiteiten met rcPICHV P18 zullen plaatsvinden op HEK293 cellen.

De aanvrager geeft aan dat tijdens de werkzaamheden handschoenen gedragen zullen worden en open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse II (VKII kabinet) zullen worden uitgevoerd. Zwangere vrouwen zullen worden uitgesloten van activiteiten met rcPICHV P18. Het te gebruiken gastheermateriaal zal vrij zijn van PICHV en andere verwante virussen.

4.1 Productie van gg-rcPICHV P18

Voor de productie van de rcPICHV P18 zal de aanvrager gebruik maken van een vijf-plasmidensysteem, analoog aan het platform beschreven door Kallert *et al.* en Dhanwani *et al.*^{14,15} Het rcPICHV P18 virus is replicatiecompetent en genetisch stabiel.

Wildtype PICHV bevat twee RNA-segmenten, L en S, waarbij op het S-segment de NP en GP coderende genen zijn gelokaliseerd. In rcPICHV P18 is het RNA verdeeld over drie segmenten. Het S-segment is 'opgesplitst', waarbij de NP en GP genen over twee verschillende artificiële S-segmenten zijn verdeeld (S_{NP} en S_{GP}). Op elk S-segment is het verwijderde virale gen vervangen door een 'multiple cloning site'. Hierin kan een gen van interesse worden ingebracht. De twee S-segmentconstructen zijn daarbij zodanig aangepast, dat de kans op homologe recombinatie - waarbij één functioneel S-segment ontstaat - verwaarloosbaar klein is.¹⁴

De drie RNA-segmenten zijn verdeeld over drie verschillende plasmiden. Twee helperplasmiden bevatten de coderende sequenties voor het nucleoproteïne (NP) en RNA polymerase van PICHV P18. Deze eiwitten zijn essentieel voor het opstarten van de productie van virus.¹⁶ De volgende vijf plasmiden zullen worden gebruikt:

- Plasmide 1 zorgt voor expressie van het NP eiwit.
- Plasmide 2 zorgt voor expressie van het L eiwit (RNA-polymerase).
- Plasmide 3 bevat de sequentie van het L-segment van PICHV P18 met de Z-eiwit en RNA-polymerase coderende genen.
- Plasmide 4 bevat het S-segment van PICHV P18 waaruit de sequentie coderend voor het GP eiwit is verwijderd, en bevat alleen het NP coderende gen. In het segment is een 'multiple cloning site' geïntroduceerd.
- Plasmide 5 bevat het S-segment van PICHV P18 waaruit de sequentie coderend voor het NP eiwit is verwijderd, en bevat alleen het GP coderende gen. In het segment is eveneens een 'multiple cloning site' geïntroduceerd.

Het uiteindelijke virus is replicatiecompetent gg-PICHV P18 met drie RNA-segmenten (één L- en twee artificiële 'S'-segmenten), dat twee geïnsereerde transgenen tot expressie kan brengen.^{14,15}

4.2 Productie van gg-r-incPICHV P18

Voor de productie van de r-incPICHV P18 zal de aanvrager gebruik maken van een vier-plasmidensysteem, analoog aan het platform beschreven door Schleiss *et al.* en Flatz *et al.*^{17,18} De r-incPICHV P18 vector is genetisch stabiel, replicatie-incompetent en daardoor biologisch ingeperkt.

In het te gebruiken plasmidensysteem zijn de S- en L-RNA segmenten verdeeld over twee verschillende plasmiden. Uit het S-segment is het GP gen verwijderd en vervangen door een 'multiple cloning site'. Hierin kan een gen van interesse worden ingebracht. Twee helperplasmiden bevatten de coderende sequenties voor het nucleoproteïne (NP) en RNA polymerase van PICHV P18. Deze eiwitten zijn essentieel voor het opstarten van de productie van virus.¹⁶ De verdeling over de vier plasmiden is als volgt:

- Plasmide 1 zorgt voor expressie van het NP eiwit.
- Plasmide 2 zorgt voor expressie van het L eiwit (RNA-polymerase).
- Plasmide 3 bevat de sequentie van het L-segment van PICHV P18 met de Z-eiwit en RNA-polymerase coderende genen.

- Plasmide 4 bevat het S-segment van PICHV P18 waaruit de sequentie coderend voor het GP eiwit is verwijderd, en bevat alleen het NP coderende gen. In het segment is een 'multiple cloning site' geïntroduceerd.

De uiteindelijke vector betreft replicatie-incompetent gg-PICHV P18 met twee RNA-segmenten (een L- en een 'artificieel' S-segment), dat één geïnsereerd transgen tot expressie kan brengen. De vector is gepseudotypeerd met de GP-eiwitten van LCMV stam WE.

5. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over PICHV. Het *Tacaribe mammarenavirus* (TCRV) heeft zij als strikt dierpathogeen ingedeeld in klasse 2.¹⁹ *Mammarenavirus* LCMV en LCMV stam WE heeft zij ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3, de mammarenavirussen JUNV, MACV en LASV heeft zij ingedeeld in pathogeniteitsklasse 4.^{19,20}

De productie van en werkzaamheden met replicatie-incompetent LCMV afgeleid van LCMV stam WE, adviseerde de COGEM wegens de biologische inperking van de betreffende ggo's op ML-II inperkingsniveau uit te voeren.²⁰ Hierbij signaleerde de COGEM dat eventuele nadelige gevolgen voor de medewerker ten gevolge van een onbedoelde infectie niet geheel uitgesloten kon worden. Om de kans op besmetting van de medewerker te minimaliseren, gaf de COGEM de aanvrager in overweging om tijdens voorgenomen handelingen handschoenen tot over de mouw te dragen.

6. Classificaties andere beoordelende instanties

De Duitse 'Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin' (BAUA) en de 'Health and Safety Executive' (HSE) van het Verenigd Koninkrijk hebben het PICHV virus ingedeeld in risicogroep 2.^{21,22} De 'American Type Culture Collection' (ATCC) heeft het uitvoeren van werkzaamheden met PICHV stam CoAn 3739 ingedeeld op veiligheidsniveau BSL2.²³ Deze instanties beoordelen pathogeniteit voor de mens. Het Zwitserse 'Federal Office for the Environment' (FOEN) en het Belgische Wetenschappelijk Instituut voor de Volksgezondheid (WIV-ISP) hebben het PICHV virus ingedeeld in risicogroep 2.^{24,25} De FOEN en WIV-ISP beoordelen naast pathogeniteit voor de mens, ook pathogeniteit voor dier en plant.

De inschalingen door deze instanties gelden als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

7. Overwegingen en advies

7.1 Pathogeniteitsclassificatie PICHV

PICHV behoort tot de mammarenavirussen, tot dit genus behoren virussen die zeer ernstige ziekte bij de mens veroorzaken. PICHV is enzoötisch in Amerika en veroorzaakt ziekten bij bepaalde knaagdieren, zoals ratten en cavia's. De primaire gastheer van het virus is de rijstrat. PICHV kan bij cavia's ziekteverschijnselen veroorzaken. Op basis van deze kenmerken is de COGEM van oordeel dat PICHV pathogeen is voor dieren.

In gebieden waar het virus enzoötisch is, bezitten sommige mensen antilichamen tegen het virus. Bij laboratoriummedewerkers die blootgesteld worden aan hoge hoeveelheden virus, zijn ook antilichaamresponses tegen het virus aangetoond. Er zijn zover bij de COGEM bekend geen ziekteverschijnselen bij de mens beschreven. PICHV is waarschijnlijk strikt dierpathogeen, maar de beschikbare gegevens bieden onvoldoende zekerheid om dit vast te stellen. Daarom kan de COGEM niet geheel uitsluiten dat het virus ook mensen kan infecteren.

De COGEM merkt op dat het op dit moment niet bekend is op welke wijze PICHV wordt overgedragen, maar zij heeft geen reden om aan te nemen dat de transmissieroute van het virus anders zal zijn dan die van andere virussen binnen het geslacht *Mammarenavirus*. Hiervan is bekend dat overdracht kan plaatsvinden via aërosolen, of via wondjes op de huid na contact met gecontamineerd materiaal (urine, uitwerpselen, speeksel) van geïnfecteerde knaagdieren.²⁶ Overdracht van PICHV18 tussen mensen onderling is nooit aangetoond.

Bovenstaande in overweging nemende, adviseert de COGEM PICHV in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

7.2 Pathogeniteit PICHV P18

PICHV P18 is afgeleid van stam An4763 en heeft 18 seriële passages in cavia's ondergaan. Deze P18 stam is zeer pathogeen voor cavia's en vertoont een op Lassakoorts gelijkend ziektebeeld bij deze dieren.^{12,13} Virus afgeleid van stam An4763 dat twee seriële miltpassages in cavia's heeft ondergaan (P2), is mild pathogeen voor cavia's.^{11,12} Op basis van deze gegevens concludeert de COGEM dat PICHV P18 zich ten opzichte van wildtype PICHV aan cavia's heeft aangepast, en ten op zichte van deze dieren in virulentie is toegenomen.

Naar aanleiding van gegevens in de literatuur merkt de COGEM op dat een An4763 stam die 8 seriële miltpassages in cavia's heeft ondergaan (P8), eveneens een toename in pathogeniteit bij cavia's heeft laten zien ten opzichte van ouderstam An4763.⁶ Deze P8 stam veroorzaakte geen of nauwelijks ziekteverschijnselen bij Syrische hamsters, Zwitserse muizen en non-humane primaten. De dieren ontwikkelden wel een antilichaamrespons tegen het virus.⁶ De COGEM concludeert derhalve dat - naar mate PICHV meer passages ondergaat in cavia's - het virus zich meer aan deze diersoort aanpast. Een hogere virulentie voor cavia's duidt niet op een toename en mogelijk op een verlaagde virulentie voor andere diersoorten.

De COGEM wijst er op dat de toename in virulentie gerelateerd is aan aminozuurveranderingen in de L en GP eiwitten. De Z-eiwitten van de P2 en P18 varianten zijn identiek. Zij acht dit van belang, omdat juist aminozuurveranderingen in het Z-eiwit gerelateerd zijn aan het veroorzaken van de ernstige ziekteverschijnselen bij de mens door bijvoorbeeld LASV en LCMV.¹⁰ De COGEM merkt op dat, ondanks de adaptatie in cavia's, PICHV18 in staat blijft menselijke HEK293 cellen te infecteren. Al het voorgaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de pathogeniteit van PICHV P18 vergelijkbaar is met die van het oudervirus (pathogeniteitsklasse 2).

7.3 Inschaling van productie van en activiteiten met gg-rcPICHV P18

De aanvrager verwacht dat rcPICHV P18 (drie RNA-segmenten) geattenuëerd zal zijn ten opzichte van wildtype PICHV (twee RNA-segmenten) en verwijst hiervoor naar de studie van Dhanwani *et*

*al.*¹⁵ In die studie wordt een vergelijkbaar van PICHV P18 platform gebruikt als bij voorliggende vergunningaanvraag, alleen met andere geïnsereerde transgene sequenties. Het betreffen óf twee markergenen coderend voor 'green fluorescent protein' (GFP), óf de coderende genen voor het haemagglutinine (HA) en nucleoproteïne (NP) van influenzavirus. Attenuatie van rcPICHV P18 blijkt *in vitro* uit een verlaging in virus titer, en *in vivo* uit een studie bij cavia's. Deze studie laat zien dat het gg-virus (drie segmenten) geen ziekte bij de dieren induceert.

De transgene sequenties die de aanvrager wil gaan insereren zijn afkomstig van HBV, hCMV, HIV, de mens en *A. victoria*. De COGEM heeft geen redenen om aan te nemen dat deze transgenen zullen leiden tot een verhoogde virulentie, maar zeer waarschijnlijk – net als de GFP, HA en NP genen in de studie van Dhanwani *et al.* – zullen bijdragen aan de attenuatie van rcPICHV P18.

Alles in ogenschouw nemende, adviseert de COGEM voorgenomen werkzaamheden uit te voeren op ML-II inperkingsniveau.

7.4 Inschaling van productie van en activiteiten met gg-r-incPICHV P18

De aanvrager geeft aan dat r-incPICHV P18 cellen kan infecteren, maar geen opvolgende cellen kan infecteren en zich verder kan verspreiden, omdat de genetische informatie voor het GP eiwit ontbreekt. Replicatie kan alleen plaatsvinden op de HEK293-GP^{WE} cellijn, die *in trans* GP^{WE} tot expressie brengt. De aanvrager geeft aan dat de kans op recombinatie met de GP^{WE} coderende sequentie in de cellijn en het S-segment van het r-incPICHV P18 virusdeeltje verwaarloosbaar klein is, omdat negatief-strengs RNA virussen zeer zelden recombineren. Daarnaast zouden er twee recombinatie-events noodzakelijk zijn omdat het GP-transcript van de cellijn niet codeert voor de terminale nucleotiden van de 5'-UTR van het S-segment. Tevens geeft de aanvrager aan dat in een vergelijkbaar systeem met op LCMV gebaseerde replicatie-incompetente vectoren is aangetoond, dat er vanuit 'gerescued replicatie-incompetent virus' geen replicatiecompetent virus werd gegenereerd, als er *in trans* geen GP werd aangeboden.¹⁷

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat r-incPICHV P18 cellen kan infecteren, maar door de afwezigheid van de GP coderende sequentie niet in staat is tot verdere verspreiding en daardoor biologisch is ingeperkt. Zij adviseert de voorgenomen werkzaamheden uit te voeren op ML-I inperkingsniveau.

8. Conclusie

Samengevat adviseert de COGEM het *Cali mammarenavirus* (PICHV; voorheen bekend als Pichinde of Pichindé virus (PICV)) in te delen in pathogeniteitsklasse 2, en de voorgenomen productie van en activiteiten met gg-rcPICHV P18 op ML-II inperkingsniveau en met gg-r-incPICHV P18 op ML-I inperkingsniveau uit te voeren.

Het kan niet geheel uitgesloten worden dat gg-PICHV onder laboratoriumomstandigheden de mens kan infecteren. De kans op verdere verspreiding is echter uitgesloten. Tijdens de voorgenomen werkzaamheden zou een medewerker als gevolg van besmetting door aerosolen of contact met besmet materiaal, onbedoeld geïnfecteerd kunnen raken met gg-PICHV. De COGEM signaleert daarom dat

vanuit ARBO-overwegingen ter bescherming van de medewerker tijdens de werkzaamheden
additionele veiligheidsmaatregelen, zoals het dragen van handschoenen, genomen moeten worden.

Referenties

1. COGEM (2014). Inventarisatie van strikt dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/141216-02
2. COGEM (2014). Criteria voor de classificatie van dierpathogene micro-organismen. COGEM signalering CGM/141013-02
3. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/bunyavirales/w/arenaviridae/1117/genus-mammarenavirus
4. Rowe WP *et al.* (1970). Serological relationship of the Tacaribe complex of viruses to Lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 5: 289-292
5. Trapido H & Sanmartin C (1971). Pichinde virus, a new virus of the Tacaribe group from Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20: 631-641
6. Jahrling PB *et al.* (1981). Pathogenesis of a Pichinde virus strain adapted to produce lethal infections in guinea pigs. *Infect. Immun.* 32: 872-880
7. Kosoy MY *et al.* (1996). Prevalence of antibodies to Arenaviruses in rodents from the Southern and Western United States: Evidence for an Arenavirus associated with the genus *Neotoma*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54: 570-576
8. Johnson KM *et al.* (1973). Biology of Tacaribe complex viruses. In: Lymphocytic choriomeningitis virus and other arena viruses. Ed. F. Lehman-Grube. Springer-Verlag, Berlin
9. Buchmeier M *et al.* (1974). Serological evidence of infection by Pichinde virus among laboratory workers. *Infect. Immun.* 9: 821-823
10. Xing J *et al.* (2015). The Z proteins of pathogenic but not non-pathogenic arenaviruses inhibit RIG-I-like receptor dependent interferon production. *J. Virol.* 89: 2944-2955
11. Lan S *et al.* (2008). Genome comparison of virulent and avirulent strains of the arenavirus Pichinde. *Arch. Virol.* 153: 1241-1250
12. Kumar N *et al.* (2012). Characterization of virulence-associated determinants in the envelope glycoprotein of Pichinde virus. *Virol.* 433: 97-103
13. McLay L *et al.* (2013). Identification of virulence determinants within the L genomic segment of the Pichindé arenavirus. *J. Virol.* 87: 6635-6643
14. Kallert SM *et al.* (2017). Replicating viral vector platform exploits alarmin signals for potent CD8+ T cell-mediated tumour immunotherapy. *Nat. Commun.* 8: 15327-15340
15. Dhanwani R *et al.* (2015). A novel live pichinde virus-based vaccine vector induces enhanced humoral and cellular immunity after a booster dose. *J. Virol.* 90: 2551-2560
16. Hallam SJ *et al.* (2018). Review of *Mammarenavirus* biology and replication. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2018.01751
17. Schleiss MR *et al.* (2017). Additive protection against congenital cytomegalovirus conferred by combined glycoprotein B/pp65 vaccination using a Lymphocytic choriomeningitis virus vector. *Clin. Vaccine Immunol.* doi: 10.1128/CVI.00300-16

18. Flatz L *et al.* (2010). Development of replication-defective lymphocytic choriomeningitis virus vectors for the induction of potent CD8+ T cell immunity. *Nat. Med.* doi: 10.1038/nm.2104
19. COGEM (2017). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/170522-03
20. COGEM (2016). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus. COGEM advies CGM/160513-01
21. Health and Safety Executive (HSE). The Approved List of biological agents (2013). www.hse.gov.uk/pubns/misc208.pdf (bezocht 28 juni 2019)
22. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAUA). TRBA 462 'Einstufung von Viren in Risikogruppen' (2012). www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-462.html (bezocht 28 juni 2019)
23. American Type Culture Collection (ATCC). www.lgcstandards-atcc.org/search#q=pichinde&sort=relevancy (bezocht 28 juni 2019)
24. Federal Office for the Environment (FOEN). Classification of Organisms (2013). www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html (bezocht 28 juni 2019)
25. Wetenschappelijk Instituut voor de Volksgezondheid (WIV-ISP). List of viruses and unconventional agents presenting at the wild state a biological risk for immunocompetent humans and/or animals and corresponding maximum biological risk (2008). www.biosafety.be/sites/default/files/h_a_virus.pdf (bezocht 28 juni 2019)
26. Emonet SE *et al.* (2011). Arenavirus reverse genetics: New approaches for the investigation of arenavirus biology and development of antiviral strategies. *Viol.* 411: 416-425