

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw S.A.M. Dijkma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 24 oktober 2017
KENMERK CGM/171024-01
ONDERWERP Advies alphavirus-replicons met donorsequenties van griepvirussen, Human respiratory syncytial virus, en Marburg- en Ebolavirussen

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van vergunningaanvraag IG 17-136_2.8-000 getiteld: 'Nucleic acid based vaccines: new vectors and transgenes' van Janssen Vaccines & Prevention B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijkheid tot vorming van 'virus-like-vesicles' (VLVs) bij werkzaamheden met alphavirus-replicons in combinatie met transgenen van Human respiratory syncytial virus, griepvirussen, en Marburg- en Ebolavirussen.

Deze genetisch gemodificeerde (gg-)replicons, kunnen na infectie geen nieuwe virusdeeltjes vormen. In de literatuur is echter beschreven dat er in sommige gevallen VLVs gevormd kunnen worden die zich van cel naar cel kunnen verspreiden.

De COGEM is van oordeel dat de kans op vorming van VLVs bij de werkzaamheden in onderhavige vergunningaanvraag zeer klein, maar niet uit te sluiten is. Er zijn redenen om aan te nemen dat de kans op VLV vorming bij de donorsequenties uit onderhavige aanvraag minder aannemelijk is dan bij de eerder beschreven gevallen in de literatuur. Als er VLVs gevormd zouden worden, is de COGEM van oordeel dat de infectiviteit, stabiliteit en pathogeniteit zeer beperkt zullen zijn. Ook acht zij de kans op verspreiding naar derden verwaarloosbaar klein.

De COGEM stemt in met de voorgestelde inschaling van de aanvrager, ML-II en DM-II, en de door Bureau GGO voorgestelde aanvullende voorschriften. Op deze inperkingsniveaus en onder navolging van enkele aanvullende voorschriften, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn.

De COGEM merkt in het advies op dat een inschaling op inperkingsniveau ML-I en DM-I ook afdoende is om de milieuveiligheid te waarborgen.



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

Hoogachtend,

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Vorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Werkzaamheden met gg-alphavirus-replicons (SFV, SINV en VEEV) met donorsequenties van griepvirussen, Human respiratory syncytial virus, en Marburg- en Ebolavirussen

COGEM advies CGM/171024-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd om te adviseren over een vergunningaanvraag (IG 17-136) getiteld: 'Nucleic acid based vaccines: new vectors and transgenes', ingediend door Janssen Vaccines & Prevention B.V. De aanvrager is van plan om werkzaamheden uit te voeren met alphavirus-replicons, afgeleid van *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV), *Semliki Forest virus* (SFV) en *Sindbis virus* (SINV). De aanvrager wil virale eiwitten van Human respiratory syncytial virus (HRSV; de 'International Committee on Taxonomy of Viruses' (ICTV) heeft recent HRSV ingedeeld in de soort *Human orthopneumovirus*)¹, *Influenza A virus* (FLUAV), *Influenza B virus* (FLUBV), en virale eiwitten van virussen uit de genera *Ebolavirus* en *Marburgvirus* m.b.v. deze replicons in dierlijke cellen tot expressie brengen. Vervolgens wil de aanvrager muizen vaccineren met de genetisch gemodificeerde (gg-)alphavirus-replicons en handelingen uitvoeren met cellen afkomstig van deze muizen.

De COGEM is door Bureau GGO om advies gevraagd over de mogelijkheid tot vorming van 'virus-like-vesicles' (VLVs) bij werkzaamheden met alphavirus-replicons in combinatie met transgenen van FLUAV, FLUBV, HRSV, en Marburg- en Ebolavirussen.

2. Alphavirus

VEEV, SFV en SINV zijn RNA virussen die behoren tot de familie *Togaviridae* en het genus *Alphavirus*.^{2,3} Alphavirussen hebben een breed gastheerbereik, waaronder vogels, zoogdieren en insecten,⁴ en worden overgedragen door insecten (voornamelijk muggen). Via deze route kunnen ook mensen geïnfecteerd raken.

Alphavirusdeeltjes hebben een diameter van ongeveer 70 nm en bevatten een positief enkelstrengs RNA genoom van 9,7 tot 11,8 kb.³ De niet-structurele eiwitten (nsP1 – nsP4) worden gecodeerd door genen in de 5' regio en zijn betrokken bij de replicatie van het virale RNA.⁵ In de 3' regio liggen de genen die coderen voor de structurele eiwitten (C, E1 en E2).² Het RNA wordt omgeven door een eiwitmantel, gevormd door het capsid eiwit (C). Om de eiwitmantel bevindt zich een lipidenmembraan waarin zich de glycoproteïnen (E1 en E2) bevinden die betrokken zijn bij de aanhechting en infectie van de gastheercel. De glycoproteïnen zijn daarmee direct van invloed op het gastheerbereik.³

SFV en SINV zijn in de Regeling GGO ingedeeld als virus van pathogeniteitsklasse 2. Het wild-type VEEV is ingedeeld als een virus van pathogeniteitsklasse 3, maar VEEV vaccinstam TC-83 is recent geclassificeerd als een klasse 2 pathogeen.⁶

2.1 Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV)

VEEV is in 1938 voor het eerst geïsoleerd uit de hersenen van zieke paarden in de deelstaat Yaracuy in Venezuela (Zuid-Amerika). Later werd het virus ook aangetroffen in de tropische en subtropische regio's van Noord- en Centraal-Amerika.⁷ VEEV kan een milde tot ernstige ziekte veroorzaken in paarden. De ziekteverschijnselen variëren van koorts tot ernstige encefalitis. VEEV kan ook een ziekte veroorzaken bij de mens. Bij volwassenen leidt een infectie doorgaans tot ziekteverschijnselen als koorts, hoofdpijn, spierpijn en keelontsteking. In jonge kinderen kan een infectie leiden tot hersenontsteking (encefalitis).^{8,9} De incidentie van encefalitis is minder dan vijf procent en de mortaliteit minder dan één procent.² Kinderen die herstellen van encefalitis, kunnen hieraan neurologische stoornissen overhouden. Bij zwangere vrouwen kan een infectie leiden tot foetale afwijkingen en miskramen.⁸

2.2 Semliki Forest virus (SFV)

SFV is in 1942 geïsoleerd uit muggen in het Semliki bos in West-Oeganda. In paarden, muizen, ratten, hamsters, konijnen en cavia's kan SFV encefalitis veroorzaken. De ernst van de ziekte is afhankelijk van de leeftijd van het dier, de transmissieroute en de virulentie van de SFV stam. Uit serosurveillances is gebleken dat infectie met SFV bij mensen relatief vaak voorkomt.² De meeste infecties bij mensen verlopen asymptomatisch of mild. De symptomen die tijdens de acute fase van infectie kunnen ontstaan zijn gewrichtspijn, koorts, hoofdpijn en spierpijn.^{2,10} In een enkel geval is een immuungecompromiteerd persoon overleden aan encefalitis na infectie met SFV.¹¹

2.3 Sindbis virus (SINV)

Het virus is voor het eerst in 1952 geïsoleerd uit muggen in Sindbis, Egypte. SINV is later ook geïsoleerd in Europa, het Midden-Oosten, Afrika, India, Azië, Australië en de Filipijnen. SINV kan verschillende vertebraten, waaronder vogels, infecteren. SINV is veel bestudeerd in muizen, waar het virus acute encefalitis kan veroorzaken. Mensen die geïnfecteerd raken met het virus kunnen koorts, huiduitslag, artritis, vermoeidheid, hoofdpijn en spierpijn ontwikkelen. De artritis kan dusdanig ernstig zijn dat de patiënt immobiel wordt. De meeste patiënten herstellen binnen twee weken, maar in enkele gevallen kan de gewrichtspijn en stijfheid maanden tot jaren aanwezig blijven. De meeste infecties verlopen echter asymptomatisch.²

3. Ebolavirus-, Marburgvirus- en HRSV - donorsequenties

3.1 Ebolavirus en Marburgvirus

Ebolavirus en *Marburgvirus* zijn twee genera die behoren tot de familie *Filoviridae*. Binnen het geslacht *Ebolavirus* worden vijf virussoorten onderscheiden (*Bundibugyo ebolavirus*, *Reston ebolavirus*, *Sudan ebolavirus* (SUDV), *Tai Forest ebolavirus* en *Zaire ebolavirus* (EBOV)). Tot het geslacht *Marburgvirus* behoort slechts één enkele soort, namelijk *Marburg marburgvirus*.¹ Al deze virussen zijn endemisch in Centraal-Afrika en veroorzaken een zeer ernstige vorm van hemorrhagische koorts bij mensen en niet-menselijke primaten. Ongeveer vijftig procent van deze ziektegevallen kent een dodelijke afloop.¹² De ziekteverschijnselen die door deze virussen veroorzaakt worden, lijken

sterk op elkaar. De ziekte presenteert zich over het algemeen acuut waarbij symptomen als algehele malaise, koorts, hoofdpijn en myalgie optreden. Daarnaast worden regelmatig andere symptomen zoals keelpijn, misselijkheid, braken, buikpijn, diarree, pijn op de borst en hoesten waargenomen. Rond de vijfde ziektedag kunnen er puntvormige huidbloedingen, bloeduitstortingen onder de huid en mucosale bloedingen optreden. Sterfte treedt doorgaans op in de tweede week na besmetting.¹³ De meest recente ebola-epidemie, die in december 2013 in West-Afrika begon, heeft wereldwijd aan meer dan 11.000 mensen het leven gekost.^{14,15} Vanwege de hoge virulentie en de afwezigheid van effectieve therapie zijn de door de COGEM geclassificeerde virussen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 4.

Marburg-, en Ebolavirussen bevatten een negatief enkelstrengs RNA genoom, van ongeveer 19 kb. Het genoom codeert voor 7 virale eiwitten, namelijk het nucleoproteïne (NP), virion proteïne (VP) 35, VP40, VP30, VP24, glycoproteïne (GP), en polymerase (L).¹⁶ Het NP, L en de VP eiwitten spelen een rol bij de transcriptie en replicatie van het genoom. VP40 en VP24 spelen daarnaast nog een rol in de samenstelling van het virusdeeltje. Het GP is betrokken bij de binding aan, en infectie van een gastheercel.¹⁶

3.2. *Human respiratory syncytial virus (HRSV)*

HRSV is een negatief enkelstrengs RNA virus van de familie van de *Pneumoviridae*, genus *Orthopneumovirus*, en is alleen pathogeen voor mensen. Het virus veroorzaakt één van de meest voorkomende lage luchtweginfecties bij zuigelingen en jonge kinderen. Meestal resulteert infectie met het virus in milde symptomen bij kinderen en volwassenen, maar 2-5% van de jonge kinderen en zuigelingen kan ernstige bronchitis ontwikkelen met ziekenhuisopname tot gevolg. Ook kan het virus ernstige infecties in de lage luchtwegen van ouderen veroorzaken, meestal in combinatie met andere ziekten, zoals chronisch obstructieve longziekten of hartfalen.¹⁷ HRSV is een zeer infectieus virus, waarbij directe besmetting via contact met besmette oppervlakken een belangrijkere rol speelt dan aëroge verspreiding via niezen of hoesten.¹⁸ Het virus wordt doorgaans 3 tot 8 dagen vanaf het moment van infectie uitgescheiden, maar uitscheiding kan in jonge kinderen of immuungecompromitteerden 3 tot 4 weken duren.¹⁹ Het virus infecteert voornamelijk type I alveolaire en niet-basilaire luchtepitheelcellen in de neuskeelholte, en mogelijk ook alveolaire macrofagen.²⁰ Nagenoeg alle personen ouder dan 2 jaar zijn in aanraking geweest met HRSV.²¹ Immuniteit tegen het virus is niet volledig beschermend en her-infectie komt herhaaldelijk voor.²² HRSV is geclassificeerd als een klasse 2 pathogeen.

Het genoom van HRSV codeert voor 11 virale eiwitten. Het betreft de niet-structurele eiwitten (NS1 en NS2), de N, P, M, M2-1, M2-2 en L eiwitten die betrokken zijn bij transcriptie, replicatie en budding, en de SH, F (fusie glycoproteïne) en G (attachment glycoproteïne) eiwitten die betrokken zijn bij binding aan, en infectie van een gastheercel.²³ Het F-eiwit zorgt voor fusie van het virus met het membraan van een gastheercel, waarna het virusgenoom de cel kan binnendringen. Het G-eiwit zorgt voor binding aan een gastheercel en is daarnaast van belang voor virale replicatie.^{24,25}

3.2 Influenzavirus A en B

Influenzavirussen, beter bekend als griepvirussen, behoren tot de familie van *Orthomyxoviridae*. Deze familie omvat onder andere de genera *Influenzavirus A*, *B*, *C* en *D*. De genera *Influenzavirus A* en *B* bevatten elk één species, respectievelijk het FLUAV en het FLUBV. Zowel het FLUAV als het FLUBV kunnen de voor griep kenmerkende verschijnselen als koorts, hoofdpijn, spierpijn, keelpijn en hoesten veroorzaken. FLUBV infecteert hoofdzakelijk mensen, en is enkele keren aangetroffen in zeehonden en oorrobber.^{26,27} FLUAV kan mensen, vogels en zoogdieren infecteren.²⁷ In tegenstelling tot FLUAV veroorzaakt FLUBV geen pandemieën. Bij gezonde mensen kan een infectie zonder ziekteverschijnselen verlopen, maar meestal wordt infectie geassocieerd met milde tot matige symptomen, zoals koorts en koude rillingen, hoesten, spierpijn, hoofdpijn, en moeheid (griep). Deze klachten duren enkele dagen tot een week. Bij ouderen en mensen met een onderliggende ziekte, kan een infectie met humane influenza virussen leiden tot ernstigere ziekteverschijnselen en tot een verhoogde kans op overlijden. Co-infectie met FLUAV en FLUBV komt zelden voor.²⁸ Jaarlijkse influenza griep epidemieën zijn verantwoordelijk voor 3 tot 5 miljoen ernstige ziektegevallen en 250.000 tot 500.000 doden wereldwijd.²⁹ Influenzavirussen worden door de lucht via aerosolen overgedragen, maar overdracht kan ook plaatsvinden via direct contact met besmette oppervlakten. Het virus infecteert luchtweg epitheelcellen en kan in deze cellen repliceren. Bij het vrijkomen van nieuwe virusdeeltjes sterven de besmette epitheelcellen af. Door deze beschadigingen aan het epitheel kunnen secundaire bacteriële infecties ontstaan, die een belangrijke oorzaak zijn van overlijden na infectie met influenza virussen.³⁰

Het negatief enkelstrengs RNA genoom van griepvirussen bestaat uit acht genoomsegmenten en codeert voor minstens 10 eiwitten, waaronder drie eiwitten die het RNA-polymerase vormen (PB1, PB2 en PA), het nucleoproteïne (NP), matrixeiwitten (M1 en M2 voor FLUAV, M1 en BM2 voor FLUBV), niet-structurele eiwitten (NS1 en NS2), en haemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA).^{31,32} Het HA eiwit is betrokken bij de aanhechting van het virus aan een gastheer cel, terwijl het NA eiwit een rol speelt bij het vrijkomen van virusdeeltjes uit een geïnfecteerde cel. Beide eiwitten spelen een belangrijke rol bij de gastheerspecificiteit en de aanmaak van antistoffen tegen influenza virussen.^{33,34}

4. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft in 2003 en 2007 geadviseerd over een vectorsysteem afgeleid van SFV.^{35,36} In 2011 heeft de COGEM positief geadviseerd over een klinische studie met een SFV vaccin tegen baarmoederhalskanker.³⁷ In 2004 heeft de COGEM geadviseerd over vectoren op basis van VEEV en SINV.³⁸ Over VEEV repliconsystemen heeft de COGEM meerdere malen geadviseerd.^{39,40,41,42,43} In de meest recente adviezen uit 2017 is positief geadviseerd over omlaagschaling naar inperkingsniveau ML-I en DM-I/D-I van werkzaamheden met gg-VEEV-TC83 replicons die het S-eiwit van *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV) tot expressie brengen. De COGEM adviseerde tevens dat bij het gebruik van andere (virale) inserts, proefdiersoorten, en/of toedieningsroutes dezelfde inschalingsniveaus gehanteerd kunnen worden bij werkzaamheden met een vergelijkbaar repliconsysteem, onder de voorwaarde (in lijn met de Regeling GGO) dat er geen schadelijke genen

ingebracht worden, of genen die mogelijk kunnen leiden tot het ontstaan van replicatiecompetent virus (RCV).⁴³ In een daaropvolgend vervolgdadvies is door de COGEM opgemerkt dat omlaagschaling alleen geldt onder voorbehoud dat de replicon-inserts het inperkende effect van de deleties in gg-VEEV niet ongedaan maken, zoals het geval zou kunnen zijn bij sequenties van virusspecies uit de *Togaviridae* of de *Rhabdoviridae*.⁴⁴ De COGEM heeft erop gewezen dat expressie van het G-eiwit van het *Indiana vesiculovirus* (voorheen vesicular stomatitis Indiana virus, VSIV), behorende tot de familie *Rhabdoviridae*, in vergelijkbare alphavirus-repliconsystemen leidt tot de vorming van ‘virus-like vesicles’ (VLVs) die zich van cel tot cel kunnen verspreiden.^{44,45,46}

5. Werkzaamheden

De aanvrager wil onderzoek verrichten naar alphavirus-replicons afgeleid van SFV, SINV, en VEEV ten behoeve van de vaccinontwikkeling. Deze replicons zullen naast enkele marker- en reporter genen (zoals GFP), ook virale eiwitten van het HRSV, FLUAV, FLUBV, EBOV, SUDV en het Marburgvirus tot expressie brengen. Deze replicons zijn zelf-replicerende RNA constructen, en worden geproduceerd door middel van een DNA plasmide waar het replicon vanaf gelezen wordt, of van RNA verkregen via *in vitro* transcriptie. De RNA constructen waarmee gewerkt zal worden, bevatten geen structurele genen uit alphavirussen, maar bevatten enkel genen die coderen voor het replicase van SFV, SINV, VEEV-wt of VEEV-TC83. Daarnaast worden genen die coderen voor de virale eiwitten F, G, N, M, M2-1 afkomstig van HRSV, of genen die coderen voor GP van twee Ebolavirussen en het Marburgvirus, of genen die coderen voor HA, NP en M1 van FLUAV en FLUBV, in het replicon ingebouwd. De aanvrager is voornemens om deze gg-replicons in te brengen in dierlijke cellen, vervolgens muizen te vaccineren met de gg-replicons en handelingen uit te voeren met cellen van deze muizen.

6. Overweging en advies

6.1 Kans op vorming VLVs

Alphavirus-replicons waarin zich geen structurele genen bevinden, kunnen efficiënt repliceren binnen een gastheercel, maar kunnen zich niet naar andere cellen verspreiden omdat er geen virusdeeltjes gevormd worden. In de literatuur is echter beschreven dat de toevoeging van een donorsequentie die codeert voor het G-eiwit van het VSIV (genus *Vesiculovirus*) in een alphavirus-repliconsysteem, leidt tot de generatie van infectieuze ‘virus-like vesicles’ (VLVs).^{45,47} Deze VLVs kunnen zich in celculturen verspreiden, doordat zij de gastheercel kunnen verlaten en andere cellen kunnen infecteren. In de onderhavige aanvraag kan volgens de aanvrager bij de voorgenomen werkzaamheden niet uitgesloten worden dat expressie van GP-eiwitten afkomstig van EBOV, SUDV en het Marburgvirus, of F-eiwitten afkomstig van HRSV in de beoogde alphavirus-repliconsystemen tot de vorming van VLVs kan leiden, via eenzelfde mechanisme als hierboven beschreven voor VSIV-G. De aanvrager stelt dat de kans dat er VLVs gevormd worden met het hemagglutinine (HA) eiwit van een griepvirus in het alphavirus-repliconsysteem nihil is.

Gegevens over de vorming van VLV's zijn schaars. In de meeste publicaties waar alphavirus-repliconsystemen worden gebruikt, wordt alleen gecontroleerd op aanwezigheid van replicatie-

competente virussen (RCV) met behulp van een PCR waarmee sequenties die coderen voor structurele eiwitten aangetoond kunnen worden. Deze sequenties zijn echter niet aanwezig in infectieuze VLVs, waardoor mogelijk een onderrapportage ontstaat over de vorming van VLVs. Vorming van VLVs is tot dusver alleen beschreven bij expressie van VSIV-G in alphavirus-repliconsystemen.

De vorming van VLVs in alphavirus-repliconsystemen is op theoretische gronden niet uit te sluiten. Er zijn echter redenen om aan te nemen dat de kans op VLV vorming bij de donorsequenties uit onderhavige aanvraag minder aannemelijk is dan bij het gebruik van VSIV-G. Zo zijn er fundamentele verschillen in membraanfusie-eiwitten tussen de verschillende virusspecies. Op basis van structurele criteria zijn er drie klassen van membraanfusie-eiwitten te onderscheiden.⁴⁸ Het VSIV-G-eiwit behoort volgens deze criteria tot klasse III, terwijl het GP-eiwit van Ebolavirussen, het F-eiwit van HRSV, en het HA-eiwit van de influenzavirussen tot klasse I behoren. Membraanfusie-eiwitten van alphavirussen behoren tot klasse II.

Het gebrek aan andere membraan- of matrixeiwitten noodzakelijk voor een goede werkzaamheid bij hechting en fusie met het celmembraan, kan de kans op de vorming van infectieuze VLVs verlagen. Zowel rhabdovirussen als filovirussen bevatten slechts één membraanglycoproteïne dat verantwoordelijk is voor zowel de aanhechting als de membraanfusie met de gastheer cel. Hierdoor is in theorie niet uit te sluiten dat er infectieuze VLVs gevormd kunnen worden. Hoewel van het GP-eiwit van Ebolavirus een proteolytische splitsing noodzakelijk wordt geacht voor de werkzaamheid, is aangetoond dat expressie van alleen het GP-eiwit van Ebolavirus in een celcultuur ervoor kan zorgen dat er pleomorfe membraanstructuren afsnoeren.⁴⁹ De GP-eiwitten die aanwezig zijn op deze membraanstructuren, zijn echter ongeordend. Wanneer er co-expressie plaatsvindt van het eiwit VP40, ontstaan er filamenteuze virus-achtige structuren met geordende GP-eiwitten.⁴⁹ Dit suggereert dat het GP-eiwit interacteert met het VP40-eiwit.

Voor een efficiënte aanhechting en membraanfusie van HRSV aan de gastheer cel is naast het F-eiwit ook een tweede (attachment) oppervlakte eiwit (G) nodig.^{50,51} Omdat het gen dat codeert voor het G-eiwit niet aanwezig is in het replicon, is de theoretische kans op vorming van VLV bij expressie van het F-eiwit van HRSV zeer klein. Echter, omdat HRSV ook zonder G-eiwit in staat is zich van cel naar cel te verspreiden⁵¹, weliswaar minder efficiënt, kan VLV vorming niet geheel uitgesloten worden.

Voor de vorming van infectieuze deeltjes bij gebruik van een glycoproteïne (HA) van griepvirussen wordt verondersteld dat co-expressie van het neuraminidase eiwit (NA) noodzakelijk is.^{47,31} Hoewel aanhechting en membraanfusie bij griepvirussen door één eiwit veroorzaakt worden (HA), is het NA-eiwit noodzakelijk om VLVs los te laten komen van het celoppervlak. De genen die coderen voor het NA eiwit van griepvirussen, worden in de onderhavige aanvraag niet ingebouwd in het alphavirus-replicon, waardoor de kans op de vorming van infectieuze VLVs zeer onwaarschijnlijk is.

Samengevat acht de COGEM de kans op het ontstaan van VLVs bij expressie van de glycoproteïnen van HRSV, FLUAV, FLUVB, en Marburg- en Ebolavirussen in alphavirus-repliconsystemen zeer klein, maar niet geheel uit te sluiten.

6.2 Risico's van eventueel gevormde VLVs

De vorming van VLVs bij alphavirus-replicons zoals beschreven voor VSIV-G gebeurt zeer inefficiënt. VLVs worden slechts in zeer kleine hoeveelheden geproduceerd (10^4 - 10^5 infectieuze units per ml⁴⁵) en zijn alleen waargenomen in celculturen. Bij herhaalde passage door cellen kunnen er puntmutaties ontstaan in de niet-structurele genen van het RNA, waardoor de vermeerderings-efficiëntie van de VLVs wordt vergroot.⁴⁵ Als er VLVs gevormd zouden worden, is de COGEM van oordeel dat de infectiviteit zeer beperkt zal zijn, aangezien de onder 6.1 genoemde andere virale eiwitten die vereist zijn voor een goede werking van de glycoproteïnen niet aanwezig zijn in de te produceren gg- replicons. Ook de stabiliteit onder natuurlijke omstandigheden en pathogeniteit van het VLV acht de COGEM zeer beperkt, omdat het hier membraanstructuren betreft, en geen virusdeeltjes.

Uit de wetenschappelijke literatuur blijkt dat vaccins op basis van alphavirus-replicons die het ebolavirus-glycoproteïne, het F-eiwit van HRSV, of het FLUAV HA-eiwit tot expressie brengen, effectief zijn en geen ziekteverschijnselen veroorzaken in proefdieren.^{52,53,54,55} Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er in de literatuur geen aanwijzingen dat VLVs ziekteverwekkend zijn voor mensen. Gegevens over de vorming van VLVs zijn gebaseerd op *in vitro* experimenten, en er zijn geen gegevens bekend over transmissie tussen gastheren en verspreiding in het milieu. Onder normale omstandigheden worden alphavirussen verspreid door muggen. Onder laboratoriumcondities kan aerogene verspreiding nooit helemaal uitgesloten worden. Door het instabiele karakter van membraanstructuren (buiten een gastheer of weefselweekomstandigheden) is de COGEM echter van oordeel dat aerogene verspreiding zeer inefficiënt zal zijn.

Bij een eventuele besmetting van een medewerker acht de COGEM het risico op verspreiding naar derden verwaarloosbaar klein. Een infectie in een immuuncompetent persoon zal snel door het immuunsysteem worden teruggedrongen. Eventuele replicatie van een VLV zal ook vele malen minder efficiënt zijn dat van een wildtype virus. Alphavirussen worden door muggen verspreid, maar verdere verspreiding van de VLVs acht de COGEM zeer onwaarschijnlijk, omdat de ingebouwde eiwitten afkomstig zijn van virussen die niet door muggen verspreid worden en VLVs daarnaast bijzonder instabiel zijn. Door de sterk verminderde stabiliteit van VLVs vergeleken met virusdeeltjes, acht de COGEM de kans op verspreiding naar derden via aerosolen ook zeer onwaarschijnlijk

6.3 Inschaling werkzaamheden

De aanvrager geeft in onderhavige vergunningaanvraag aan de *in vitro* werkzaamheden uit te willen voeren op ML-II inperkingsniveau, en de *in vivo* werkzaamheden op DM-II inperkingsniveau. De COGEM kan gezien bovenstaande overwegingen instemmen met het inschalingsvoorstel van de aanvrager.

Ook kan de COGEM instemmen met de door Bureau GGO voorgestelde aanvullende voorschriften:

- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- Het te gebruiken gastheermateriaal is vrij van SFV, SINV, VEEV en andere verwante virussen;

- Bij werkzaamheden met proefdieren (*Mus* spp) dienen de dieren gehuisvest te worden in filtertopkooien.

Voor activiteiten met FACS apparatuur gelden tevens de aanvullende voorschriften opgenomen in Bijlage 9 van de Regeling ggo.

De COGEM wijst erop dat de vorming van VLVs zeer onwaarschijnlijk is, maar theoretisch niet uitgesloten kan worden. De COGEM acht de kans op verspreiding naar derden verwaarloosbaar klein. De voorgestelde additionele maatregelen zijn hoofdzakelijk gericht op de bescherming van de laboratoriummedewerker (m.u.v. het voorschrift over de afwezigheid van SFV, SINV, VEEV en andere verwante virussen in het te gebruiken gastheermateriaal), en niet op de inperking van eventuele milieurisico's.

6.4 Opmerking bij inschaling

Op basis van de bovengenoemde overwegingen is de COGEM van oordeel dat de werkzaamheden met alphavirus-repliconsystemen ook op ML-I of DM-I inperkingsniveau ingeschaald kunnen worden. De COGEM acht de kans op vorming van VLVs in alphavirus-repliconsystemen met donorsequenties uit onderhavig advies zeer klein. Verder worden VLVs zeer inefficiënt gevormd en zijn eventueel gevormde VLVs niet ziekteverwekkend voor proefdieren. Verder acht zij de kans op verspreiding naar derden verwaarloosbaar klein. De COGEM wijst erop dat de eerder genoemde maatregelen ter bescherming van de medewerker onverkort gehandhaafd moeten blijven. Deze omlaagschaling geldt ook voor werkzaamheden met VEEV-wt replicons (uit pathogeniteitsklasse 3), aangezien de virulentie van VEEV voornamelijk bepaald wordt door structurele eiwitten, die niet aanwezig zullen zijn in de gg-VEEV replicons.

7. Conclusie

De COGEM stemt in met de voorgestelde inschaling van de werkzaamheden door de aanvrager. Op deze inperkingsniveaus is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden, verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht 24 oktober 2017)
2. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: Fields virology, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
3. Powers A *et al.* (2012). Family *Togaviridae*. In Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
4. Smerdou C & Liljeström P (1999). Two-helper RNA system for production of recombinant *Semliki Forest virus* Particles. J. Virol. 73: 1092–1098
5. Rupp JC *et al.* (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. J. Gen. Virol. 96: 2483–2500

6. COGEM (2017). Pathogeniteitsclassificatie van *Venezuelan equine encephalitis virus* vaccinstam TC-83. COGEM advies CGM/170328-05
7. Weaver SC *et al.* (2004). Venezuelan equine encephalitis. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 141-174
8. Griffin DE (2008). Togaviruses: Equine encephalitic viruses. In: *Encyclopedia of virology*, third edition. Ed. Mahy BWJ & Van Regenmortel MHV, Elsevier Ltd.
9. Taylor KG & Paessler S (2013). Pathogenesis of Venezuelan equine encephalitis. *Vet. Microbiol.* 167: 145-150
10. Lundberg L *et al.* (2017). *Venezuelan equine encephalitis virus* capsid – The clever caper. *Viruses* 279: doi:10.3390/v9100279
11. Willems WR *et al.* (1979). *Semliki Forest virus*: Cause of a fatal case of human encephalitis. *Science* 203: 1127–1129
12. World Health Organization (WHO). Ebola virus disease. Fact sheet. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/en/ (bezocht 24 oktober 2017)
13. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). LCI-richtlijn Virale hemorrhagische koorts: Filovirussen. <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/virale-hemorragische-koorts-filovirussen> (bezocht 16 oktober 2017)
14. Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). Ebola-uitbraak West-Afrika 2014/2015 www.rivm.nl/Onderwerpen/E/Ebola/Ebola_uitbraak_West_Afrika_2014_2015 (bezocht 16 oktober 2017)
15. World Health Organization (WHO). Situation Report. www.who.int/csr/disease/ebola/en/ (bezocht 16 oktober 2017)
16. Feldmann H *et al.* (2013). *Filoviridae*: Marburg and Ebola viruses. In: *Fields virology*, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
17. Hall CB *et al.* (2013). Clinical and epidemiological features of respiratory syncytial virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 372: 39-57
18. Falsey AR & Walsh EE (2000). Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 371-284
19. Kimberling DW *et al.* (2015). Respiratory Syncytial Virus. In: 2015 Report of the committee on infectious diseases. *American Academy of Pediatrics.* 667-676
20. Johnson JE *et al.* (2007). The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Mod. Pathol.* 20: 108-119
21. DeVincenzo JP *et al.* (2010). Viral load drives disease in humans experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182: 1305-1314
22. Openshaw PJM *et al.* (2017). Protective and harmful immunity to RSV infection. *Annu. Rev. Immunol.* 35: 501–532
23. Lee WJ *et al.* (2012). Complete genome sequence of Human respiratory syncytial virus genotype A with a 72-nucleotide duplication in the attachment protein G gene. *J. Virol.* 86: 13810-13811
24. Teng MN *et al.* (2001). Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication *in vitro* and *in vivo*. *Virology* 289: 283-296
25. Maher CF *et al.* (2004). Recombinant respiratory syncytial virus lacking secreted glycoprotein G is attenuated, non-pathogenic but induces protective immunity. *Microbes Infect.* 6: 1049- 1055

26. Osterhaus ADME *et al.* (2000). *Influenza B virus* in seals. *Science* 288: 1051-3
27. Fereidouni S *et al.* (2016). Influenza virus infection of marine mammals. *EcoHealth* 13: 161-170
28. Pérez-García F *et al.* (2016). Influenza A and B co-infection: a case-control study and review of the literature. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 35: 941-946
29. World Health Organisation (WHO). Influenza (seasonal) fact sheet.
www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/ (bezoekt 17 oktober 2017)
30. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). LCI-richtlijn Influenza.
<https://lci.rivm.nl/richtlijnen/influenza> (bezoekt 17 oktober 2017)
31. Wright PF *et al.* (2013). Orthomyxoviruses. In: *Fields virology*, volume 1, sixth edition. Edited by Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia
32. McCauley JW *et al.* (2012). The negative sense single stranded RNA viruses. Family *Orthomyxoviridae*. In: *Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
33. Brown EG (2000). Influenza virus genetics. *Biomed. Pharmacother.* 54: 196-209
34. Zambon MC (2001). The pathogenesis of influenza in humans. *Rev. Med. Virol.* 11: 227-241
35. COGEM (2003). Combinatie vaccines voor HIV-1. COGEM advies CGM/030604-02
36. COGEM (2007). *Semliki Forest virus* vector met een transgen voor de lichte keten van botuline neurotoxine. COGEM advies CGM/070723-02
37. COGEM (2011). Klinische studie met een *Semliki Forest virus* vaccin tegen baarmoederhalskanker. COGEM advies CGM/111222-02
38. COGEM (2004). Constructie en productie van alphavirusvectoren. COGEM advies CGM/040212-02
39. COGEM (2009). Inschaling van werkzaamheden met op het VEE virus gebaseerde replicondeeltjes. COGEM advies CGM/090603-01
40. COGEM (2015). Inschaling van werkzaamheden met replicons afgeleid van het *Venezuelan equine encephalitis virus*. COGEM advies CGM/150715-01
41. COGEM (2016). Inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met replicons afgeleid van *Venezuelan equine encephalitis virus*. COGEM advies CGM/160815-01
42. COGEM (2016). Onderbouwing van omlaagschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met gg-VEEV replicons. COGEM advies CGM/160906-02
43. COGEM (2017). Omlaagschaling van *in vivo* en *in vitro* werkzaamheden met *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) replicons. COGEM advies CGM/170224-01
44. COGEM (2017). Vervolgadviesvraag VEEV replicons en noodzaak RCV test. COGEM advies CGM/170322-03
45. Rose NF *et al.* (2014). *In vitro* evolution of high-titer, virus-like vesicles containing a single structural protein. *PNAS* 111: 16866–16871
46. van den Pol AN *et al.* (2017) Chikungunya, Influenza, Nipah, and Semliki Forest Chimeric viruses with Vesicular Stomatitis Virus: Actions in the brain. *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.02154-16
47. Rolls MM *et al.* (1994). Novel infectious particles generated by expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein from a self-replicating RNA. *Cell* 79: 497-506

48. White JM *et al.* (2008). Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 43:189-219
49. Noda T *et al.* (2012). Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP. *J. Virol.* 76: 4855-4865
50. Collins PL & Graham BS (2008). Viral and host factors in Human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J. Virol.* 82: 2040-2055
51. McLellan *et al.* (2013). Structure and function of RSV surface glycoproteins. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 372: 83-104
52. Pushko P *et al.* (2000). Recombinant RNA replicons derived from attenuated *Venezuelan equine encephalitis virus* protect guinea pigs and mice from Ebola hemorrhagic fever virus. *Vaccine* 19: 142-153
53. Bates JT *et al.* (2016). Immunogenicity and efficacy of alphavirus-derived replicon vaccines for respiratory syncytial virus and human metapneumovirus in nonhuman primates. *Vaccine.* 34: 950-956
54. Hubby B *et al.* (2007). Development and preclinical evaluation of an alphavirus replicon vaccine for influenza. *Vaccine* 25: 8180-8189
55. Erdman MM *et al.* (2010). Alphavirus replicon particle vaccines developed for use in humans induce high levels of antibodies to influenza virus hemagglutinin in swine: Proof of concept. *Vaccine* 28: 594-596