

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
Mevrouw drs. S. van Veldhoven-van der Meer
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 15 april 2019
KENMERK CGM/190415-01
ONDERWERP Advies werkzaamheden met gg-Sindbis virus replicons met het 'amyloid precursor protein' (APP) gen

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van vergunningaanvraag IG 19-006_IIk-000 getiteld 'Synaptisch plasticiteit in de ziekte van Alzheimer' van de Universiteit van Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over laboratoriumwerkzaamheden met een genetisch gemodificeerde (gg-) *Sindbis virus* (SINV) vector die het eiwit 'amyloid precursor protein' (APP) tot expressie brengt. APP is een lichaamseigen eiwit waaruit onder bepaalde omstandigheden het eiwit A β gevormd kan worden. Samenklontering (aggregatie) van A β wordt in verband gebracht met het ontstaan van onder andere de ziekte van Alzheimer.

De COGEM kan niet uitsluiten dat er tijdens de productie van gg-SINV vectordeeltjes replicatiecompetent virus (RCV) dat codeert voor het APP eiwit, gevormd kan worden. Bij de voorgenomen werkzaamheden bestaat de mogelijkheid dat een medewerker, door een prikincident of als gevolg van besmetting door aerosolen, onbedoeld geïnfecteerd raakt met gg-SINV vector die APP tot expressie brengt. Dit kan mogelijk nadelige gevolgen hebben voor de medewerker.

SINV kan niet van mens-op-mens worden overgedragen, hierdoor acht de COGEM de kans op verspreiding van gg-SINV vectordeeltjes naar derden verwaarloosbaar klein.

De COGEM adviseert de voorgenomen werkzaamheden met de gg-SINV vectordeeltjes uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. Onder inachtneming van dit inperkingsniveau acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij voorgenomen handelingen verwaarloosbaar klein. De COGEM signaleert dat vanuit ARBO-overwegingen bij de werkzaamheden aanvullende voorschriften genomen moeten 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, Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

Werkzaamheden met gg-*Sindbis virus* replicons met het ‘amyloid precursor protein’ (APP) gen

COGEM advies CGM/190415-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd om te adviseren over een vergunningaanvraag (IG 19-006) getiteld ‘Synaptisch plasticiteit in de ziekte van Alzheimer’, ingediend door de Universiteit van Amsterdam. De aanvrager is van plan om werkzaamheden uit te voeren met *Sindbis virus* (SINV) afgeleide replicons die het gen coderend voor het eiwit ‘amyloid precursor protein’ (APP) bevatten.

De COGEM is door Bureau GGO gevraagd om te adviseren over (1) de mogelijkheid tot vorming van replicatiecompetent virus (RCV), (2) de mogelijkheid van RCV vorming met daarin het volledige APP gen en (3) de eventuele extra aanvullende maatregelen (en/of inperking) die zij noodzakelijk acht ter bescherming van mens en milieu bij de voorgenomen handelingen met gg-SINV virusdeeltjes die APP tot expressie brengen.

2. *Sindbis virus* (SINV)

Sindbis virus (SINV) is een RNA virus behorende tot de familie *Togaviridae* en het genus *Alphavirus*.^{1,2} Alphavirussen hebben een breed gastheerbereik, waaronder vogels, zoogdieren en insecten.³ SINV is een zogenaamd ‘arthropod borne virus’ en wordt 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.² De niet-structurele eiwitten (nsP1 – nsP4) worden gecodeerd door genen in de 5’ regio van het genoom en zijn betrokken bij de replicatie van het virale RNA.⁴ In de 3’ regio liggen de genen die coderen voor de structurele eiwitten (C, E1 en E2).¹ 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.²

SINV 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.¹

Mensen kunnen als gevolg van een muggenbeet geïnfecteerd raken met SINV en worden beschouwd als een ‘dead-end’ gastheer.^{5,6} Er zijn geen aanwijzingen dat SINV van mens-op-mens kan worden overgedragen.

Onder laboratoriumomstandigheden kan SINV besmetting door aerosolen niet geheel worden uitgesloten.⁷

Mensen die geïnfecteerd raken met het virus kunnen koorts, huiduitslag, artritis, vermoeidheid, hoofdpijn en spierpijn krijgen. 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.¹

3. Amyloid precursor protein (APP) - donorsequentie

Het lichaamseigen ‘amyloid precursor protein’ (APP) is een transmembraaneiwit en komt onder andere voor in neuronen. APP isovormen variëren in lengte van 305 tot 770 aminozuren. Klieving van APP kan plaatsvinden via de ‘non-amyloidogenic pathway’ of de ‘amyloidogenic pathway’. In de ‘non-amyloidogenic pathway’ wordt APP gekliefd door α - en γ -secretase. In de ‘amyloidogenic pathway’ wordt APP achtereenvolgens door β - en γ -secretase gekliefd, resulterend in de vorming van het amyloid- β peptide ($A\beta$).⁸

$A\beta$ komt van nature voor in de hersenen, de cerebrospinale vloeistof en het plasma van gezonde individuen, maar is ook geassocieerd met de ziekte van Alzheimer. Er zijn verscheidene $A\beta$ peptides die ontstaan na klieving van APP. De meest voorkomende isovorm van $A\beta$ is $A\beta_{40}$ (40 aminozuren), gevolgd door $A\beta_{42}$ (42 aminozuren). $A\beta_{42}$ is hydrofoob en kan makkelijker fibrillen vormen.⁸

De ziekte van Alzheimer is geassocieerd met aanwezigheid van misgevouwen, geaggregeerde $A\beta$ peptides en tau eiwitten in de hersenen, in de vorm van extracellulaire ‘senile plaques’ bestaande uit $A\beta_{42}$, en intracellulaire ‘neurofibrillary tangles’ (NFT) bestaande uit hypergefosforyleerd tau.⁸ $A\beta$ kan vergelijkbare plaques vormen in de wanden van cerebrale bloedvaten, dit veroorzaakt de ziekte cerebrale amyloïdangiopathie (CAA).⁹

In het verleden zijn mensen behandeld met batches humaan groeihormoon afkomstig van kadavers (c-hGH), die later gecontamineerd bleken met prionen, tau en $A\beta$ peptides.^{10,11} In de hersenen van overleden individuen die deze behandeling ondergingen kon $A\beta$ pathologie worden gedetecteerd.¹⁰ Recent experimenteel onderzoek laat zien dat intracerebrale injectie van dit c-hGH materiaal bij transgene muizen die gehumaniseerd $A\beta$ tot expressie brengen, $A\beta$ ‘plaques’ en CAA kan veroorzaken.¹¹ Dit roept de vraag op of transmissie van $A\beta$ pathologie van mens-op-mens als gevolg van toediening van $A\beta$ -gecontamineerde groeihormonen een mogelijke besmettingsroute is. $A\beta$ pathologie kan zich niet via een natuurlijke transmissieroute van mens-op-mens verspreiden.²⁴

4. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft SINV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.¹² In het verleden heeft de COGEM meerdere malen geadviseerd over repliconsystemen gebaseerd op alphavirussen.^{o.a. 13,14,15,16,17,18} In 2004 heeft de COGEM geadviseerd over vectoren op basis van *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) en SINV.¹⁹ In 2017 heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met onder andere gg-SINV replicons in combinatie met transgenen van Human respiratory syncytial virus, griepvirussen, en Marburg- en Ebolavirussen.²⁰

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over werkzaamheden met APP. Wel heeft zij meerdere malen geadviseerd over werkzaamheden met andere aggregerende eiwitten waaronder α -synucleïne, tau en het prion eiwit (PrP).^{o.a. 21,22,23}

Naar aanleiding van vragen en zorgen uit het werkveld over risico’s met werkzaamheden van aggregerende eiwitten (anders dan prionen) die mogelijk betrokken zijn bij neurodegeneratieve ziektes

(zoals de ziekte van Alzheimer en Parkinson), heeft de COGEM een inventarisatie laten uitvoeren van de beschikbare informatie over de aard van deze aggregerende eiwitten en de mogelijke risico's die de werkzaamheden met deze eiwitten met zich meebrengen. Op basis van de wetenschappelijke informatie beschreven in het onderzoeksrapport⁸, waaruit onder meer blijkt dat er geen aanwijzingen zijn voor transmissie of infectiositeit, was de COGEM van oordeel dat inperkingsmaatregelen niet nodig zijn om de milieuveiligheid te waarborgen. Alleen bij handelingen met replicerende vectorsystemen in combinatie met aggregerende eiwitten dienen extra inperkingsmaatregelen in acht genomen te worden. De COGEM signaleerde verder dat vanuit ARBO-overwegingen wel veiligheidsmaatregelen noodzakelijk zijn om laboratoriummedewerkers te beschermen.²⁴

5. Werkzaamheden

De aanvrager is voornemens onderzoek te verrichten naar de ziekte van Alzheimer. Hiervoor wil de aanvrager met behulp van gg-SINV replicondeeltjes verschillende eiwitten waaronder APP, tot expressie brengen in gekweekte neuronen. Voor de productie van de gg-replicondeeltjes maakt de aanvrager gebruik van een zogenaamd mono-helper systeem (replicon RNA + helper RNA). Het replicon RNA bevat de sequentie coderend voor de niet-structurele eiwitten en de donorsequentie van interesse. Het helper RNA codeert voor de structurele virale eiwitten die nodig zijn om het recombinante genoom in te pakken. Om de gg-replicondeeltjes te genereren wordt het replicon RNA samen met het helper RNA genaamd DH-BB(5'SIN;TE12ORF) in dierlijke cellen getransfecteerd. In deze cellen zijn volgens de aanvrager geen wild-type SINV of andere alphavirussen aanwezig.

Het replicon RNA en helper RNA worden geproduceerd door *in vitro* transcriptie van respectievelijk het DNA plasmide pSinRep5 en het helper plasmide DH-BB(tRNA;TE12). Het helper RNA DH-BB(5'SIN;TE12ORF) bevat de coderende sequenties voor de structurele eiwitten van de neurovirulente SINV laboratoriumstam TE12.²⁵ De resulterende gg-vectordeeltjes hebben hierdoor een neurotropisme.

Met betrekking tot de onderhavige vergunningaanvraag is de COGEM door Bureau GGO gevraagd om te adviseren over (1) de mogelijkheid tot vorming van replicatiecompetent virus (RCV), (2) de mogelijkheid van RCV vorming met daarin het volledige *APP* gen en (3) de eventuele extra aanvullende maatregelen (en/of inperking) die zij noodzakelijk acht ter bescherming van mens en milieu bij de voorgenomen handelingen met gg-SINV virusdeeltjes die *APP* tot expressie brengen.

6. Overweging

6.1 Kans op vorming van RCV

Voor de productie van de gg-SINV replicondeeltjes is de aanvrager voornemens gebruik te maken van een mono-helper systeem (replicon RNA + helper RNA). Hierbij complementeert het helper RNA na transcriptie *in trans* de benodigde structurele eiwitten. In theorie wordt hierdoor alleen het replicon RNA in een vectordeeltje ingepakt, deze vectordeeltjes kunnen wel een cel infecteren en erin repliceren, maar zijn niet in staat om nieuwe vectordeeltjes te vormen en naar andere cellen te verspreiden.

Uit de literatuur blijkt echter dat bij dergelijke mono-helpersystemen regelmatig replicatiecompetent virus (RCV) ontstaat.^{26,27,28} RCV kan ontstaan als er tijdens de productie van de gg-replicondeeltjes recombinatie optreedt tussen het replicon en helper RNA, of als het helper RNA ingepakt wordt in een vectordeeltje en samen met replicon RNA-ingepakte virusdeeltjes in de vectorbatch aanwezig is.

Het helper RNA waarmee de aanvrager voornemens is te gaan werken, DH-BB(5'SIN;TE12ORF), bevat volgens de aanvrager geen 'packaging signaal'. De aanvrager stelt dat DH-BB(5'SIN;TE12ORF) hierdoor niet in een vectordeeltje zal worden ingepakt waardoor er geen RCV kan ontstaan, en verwijst hiervoor naar een studie van Kebschull *et al.* (2016).²⁹ In deze studie is RCV vorming getest met een 'plaque assay'. Hierbij zijn BHK-21 cellen geïnfecteerd met geproduceerde gg-SINV-GFP vectordeeltjes die ingepakt zijn met DH-BB(5'SIN;TE12ORF). Na 24 uur zijn de cellen gefixeerd en zijn de GFP-positieve plaques gescoord. Aangezien de gg-vectordeeltjes geproduceerd met DH-BB(5'SIN;TE12ORF) geen plaques produceerden, concluderen de auteurs dat DH-BB(5'SIN;TE12ORF)-ingepakt virus 'propagatie-incompetent' is. In deze 'plaque assay' werd gescoord op GFP-expressie vanaf het replicon. De COGEM wijst er op dat met deze methode een RCV waaruit het *GFP* gen is verwijderd, als gevolg van recombinatie, niet gedetecteerd zal worden. Ook merkt de COGEM op dat nadere informatie ontbreekt over de gevoeligheid van de 'plaque assay'. Gegevens over de gebruikte verdunningen van geproduceerde gg-SINV vectordeeltjes in 'plaque assay' ontbreken eveneens. Daarnaast heeft er geen passage plaatsgevonden van de replicondeeltjes, terwijl seriële passage een gevoeliger manier is om RCV te detecteren.²⁷

De COGEM is van oordeel dat door de afwezigheid van een 'packaging signaal' op het helper RNA, het DH-BB(5'SIN;TE12ORF) niet zal worden ingepakt in een vectordeeltje. De COGEM kan, op basis van alle beschikbare data, echter niet uitsluiten dat, met het mono-helpersysteem dat de aanvrager voornemens is te gebruiken, er tijdens de co-transfectie van replicon RNA en DH-BB(5'SIN;TE12ORF) recombinatie optreedt en RCV gevormd kan worden.

Gezien de maximale packagingcapaciteit van SINV (ongeveer 2-3 kb bovenop de genomegrootte) kan de COGEM eveneens niet uitsluiten dat er RCV met het volledige *APP* gen (~ 2 kb) gevormd kan worden tijdens de productie van gg-SINV vectordeeltjes.

6.2 Risico van blootstelling aan gg-SINV vectordeeltjes

Bij de voorgenomen laboratoriumwerkzaamheden bestaat de mogelijkheid dat een medewerker als gevolg van een prikincident geïnfecteerd raakt, met al dan niet replicatiecompetente, gg-SINV vectordeeltjes die het *APP* gen bevatten. Ook kan SINV besmetting door aerosolen onder laboratoriumomstandigheden niet geheel worden uitgesloten.

Transmissie van SINV naar een mens vindt plaats als gevolg een steek van een SINV-besmette mug. Mensen worden beschouwd als een 'dead-end' gastheer, SINV kan niet van mens-op-mens worden overgedragen. Hierdoor acht de COGEM, onafhankelijk van het al dan niet replicerend vermogen van de gg-SINV vectordeeltjes, de kans op verspreiding vanuit een besmette medewerker naar derden verwaarloosbaar klein.

De COGEM wijst erop dat indien een medewerker onbedoeld wordt blootgesteld aan, al dan niet replicatiecompetente, gg-SINV deeltjes met daarin het *APP* gen, dit er toe kan leiden dat *APP* tot expressie komt in de cellen van de medewerker. Dit kan mogelijk nadelige gevolgen hebben voor de

medewerker, omdat uit APP onder bepaalde omstandigheden het aggregerende eiwit A β kan ontstaan wat geassocieerd is met A β pathologie.

Recent experimenteel onderzoek laat zien dat intracerebrale injectie van c-hGH materiaal dat gecontamineerd was met A β , bij transgene muizen tot A β pathologie kan leiden.¹¹ De COGEM merkt hierbij op dat A β pathologie zich niet via een natuurlijke transmissieroute van mens-op-mens kan verspreiden.²⁴

Alles in ogenschouw nemende acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er transmissie van A β pathologie van een laboratoriummedewerker, die besmet is met, al dan niet replicatiecompetente, gg-SINV deeltjes met daarin het *APP* gen, naar derden zou kunnen optreden.

7. Advies

De COGEM adviseert de voorgenomen werkzaamheden met gg-SINV vectordeeltjes die coderen voor APP uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. Onder in acht neming van dit inperkingsniveau acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij voorgenomen handelingen verwaarloosbaar klein.

De COGEM signaleert dat tijdens de voorgenomen werkzaamheden een medewerker, door een prikincident of als gevolg van besmetting door aerosolen, onbedoeld geïnfecteerd zou kunnen raken met (al dan niet replicerende) gg-SINV replicondeeltjes die het *APP* gen bevatten. De COGEM signaleert daarom dat vanuit ARBO-overwegingen bij de werkzaamheden handschoenen gedragen moeten worden, open handelingen uitgevoerd moeten worden in een veiligheidskabinet klasse 2 en handelingen met 'sharps' tot een minimum beperkt moeten worden ter bescherming van de medewerker.

Referenties

1. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: Fields virology, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
2. 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
3. Smerdou C & Liljeström P (1999). Two-helper RNA system for production of recombinant *Semliki Forest virus* Particles. J. Virol. 73: 1092–1098
4. Rupp JC *et al.* (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. J. Gen. Virol. 96: 2483–2500
5. Eldridge BF *et al.* (2004). Chapter 11 Arbovirus Diseases (2004). In: Medical Entomology: A textbook on Public Health and Veterinary Problems Caused by Arthropods. Ed. Eldridge BF & Edman JD, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands
6. MacLachlan NJ & Dubovi EJ (2016). Chapter 28 *Togaviridae*. In: Fenner's Veterinary Virology, fifth edition, Ed. MacLachlan NJ & Dubovi EJ, Elsevier

7. Government of Canada. Pathogen Safety Data Sheets: Infectious Substances – *Sindbis virus* (SINV). <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/sindbis-virus-pathogen-safety-data-sheet.html> (bezoekt: 1 april 2019)
8. Geragousian *et al.* (2017). Aggregated proteins; Are they infectious? COGEM onderzoeksrapport CGM 2017-01.
9. Huynh TV & Holtzman DM (2018). Amyloid- β 'seeds' in old vials of growth hormone. *Nature* 564: 354-355
10. Jaunmuktane Z *et al.* (2015). Evidence for human transmission of amyloid- β pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature* 525: 247-250
11. Purro SA *et al.* (2018) Transmission of amyloid- β protein pathology from cadaveric pituitary growth hormone. *Nature*. 564: 415-419
12. COGEM (2017). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/170522-03
13. COGEM (2015). Inschaling van werkzaamheden met replicons afgeleid van het *Venezuelan equine encephalitis virus*. COGEM advies CGM/150715-01
14. COGEM (2016). Inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met replicons afgeleid van *Venezuelan equine encephalitis virus*. COGEM advies CGM/160815-01
15. COGEM (2016). Onderbouwing van omlaagschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met gg-VEEV replicons. COGEM advies CGM/160906-02
16. COGEM (2017). Omlaagschaling van *in vivo* en *in vitro* werkzaamheden met *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) replicons. COGEM advies CGM/170224-01
17. COGEM (2007). *Semliki Forest virus* vector met een transgen voor de lichte keten van botuline neurotoxine. COGEM advies CGM/070723-02
18. COGEM (2017). Advies inschaling van werkzaamheden met gg-VEEV en gg-SPDV replicons. COGEM advies CGM/171030-03
19. COGEM (2004). Constructie en productie van alphavirusvectoren. COGEM advies CGM/040212-02
20. COGEM (2017). Advies alphavirus-replicons met donorsequenties van griepvirussen, Human respiratory syncytial virus, en Marburg- en Ebolavirussen. COGEM advies CGM/171024-01
21. COGEM (2016). Advies over inschaling van *in vitro* werkzaamheden met α -synucleïne coderende adenovirale vectoren. COGEM advies CGM/160115-02
22. COGEM (2016). Inschaling van werkzaamheden met het aggregerende eiwit tau. CGM/161018-01
23. COGEM (2017). Advies inschaling *in vitro* werkzaamheden met recombinant humaan prion-eiwit. COGEM advies CGM/170825-01
24. COGEM (2017). Adviserende aanbiedingsbrief over werkzaamheden met aggregerende eiwitten en ggo's. COGEM advies CGM/170316-04
25. Lustig S *et al.* (1988). Molecular basis of *Sindbis virus* neurovirulence in mice. *J. Virol.* 62: 2329-2336
26. Bredenbeek PJ *et al.* (1993). *Sindbis virus* expression vectors: packaging of RNA replicons by using defective helper RNAs. *J. Virol.* 67:6439-6446
27. Frolov I *et al.* (1997). *Sindbis virus* replicons and *Sindbis virus*: assembly of chimeras and of particles deficient in virus RNA. *J. Virol.* 71:2819-2829

28. Whalfors JJ *et al.* (2000). Evaluation of recombinant alphaviruses as vectors in gene therapy. *Gene Ther.* 7: 472-480
29. Kebschull JM *et al.* (2016). A New Defective Helper RNA to Produce Recombinant *Sindbis Virus* that Infects Neurons but does not Propagate. *Front Neuroant.* 10:56