

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

DATUM 24 februari 2017
KENMERK CGM/170224-01
ONDERWERP Advies omlaagschaling werkzaamheden met gg-VEEV RNA replicons

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van vergunningaanvraag IG 16-193_2.8-001 getiteld: 'Omlaagschaling *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met alphavirus RNA deeltjes' van Intervet International B.V. deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd opnieuw te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-)virusdeeltjes gebaseerd op het *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV). Deze gg-virusdeeltjes, ook wel replicons genoemd, kunnen na infectie geen nieuwe virusdeeltjes vormen en kunnen zich niet verder verspreiden. Daarnaast is het gen dat codeert voor een oppervlakte eiwit van het *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV) in het replicon RNA geïntroduceerd. De aanvrager wil deze replicons testen in varkens als vaccinatie tegen PEDV.

In een voorgaand advies heeft de COGEM geadviseerd de *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden op ML-II en DM-II niveau uit te mogen voeren. De COGEM heeft destijds opgemerkt dat de werkzaamheden mogelijk omlaaggeschaald kunnen worden als de technische specificaties, de gebruikte controles en de wijze waarop de test op replicatiecompetent virus (RCV) gevalideerd is, overlegd worden. In de huidige vergunningaanvraag heeft de aanvrager deze gegevens toegevoegd, en vraagt om verdere omlaagschaling naar inperkingsniveau ML-I en D(M)-I voor huidige en toekomstige werkzaamheden.

De COGEM is van mening dat de aangeleverde informatie voldoende bewijs levert over de veiligheid om in te stemmen met een omlaagschaling naar ML-I en DM-I niveau voor huidige en toekomstige *in vivo* en *in vitro* werkzaamheden. Gevraagd wordt om onder bepaalde voorwaarden de geïnoculeerde dieren op D-I niveau te mogen huisvesten. De COGEM kan hier, gezien de aangeleverde gegevens, mee instemmen.

Op deze inperkingsniveaus is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn.



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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

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

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

Omlaagschaling van *in vivo* en *in vitro* werkzaamheden met *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) replicons

COGEM advies CGM/170224-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van vergunningaanvraag IG 16-193_2.8-001 getiteld: 'Omlaagschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met alphavirus RNA deeltjes' van Intervet International B.V. is de COGEM gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van de voorgenomen werkzaamheden. De COGEM heeft eerder een advies uitgebracht over de inschaling van de *in vivo* en *in vitro* werkzaamheden met deze genetisch gemodificeerde (gg)- alphavirus RNA deeltjes, afgeleid van het *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV)¹ en later in een tweede advies de overweging nader toegelicht.² De gg-VEEV replicons zijn replicatie-incompetent en bevatten het gen dat codeert voor het markereiwit green fluorescent protein (GFP), of het gen dat codeert voor het structurele eiwit (Spike(S)-eiwit) van het *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV). In haar voorgaande advies heeft de COGEM geadviseerd de *in vitro* werkzaamheden op ML-II niveau en de *in vivo* werkzaamheden op DM-II niveau uit te voeren.¹ De COGEM heeft in haar advies opgemerkt dat de werkzaamheden mogelijk omlaageschaald kunnen worden als de technische specificaties, de gebruikte controles en de wijze waarop de test op replicatiecompetent virus (RCV) gevalideerd is, overlegd worden.¹ In de huidige vergunningaanvraag heeft de aanvrager additionele informatie aangeleverd, en verzoekt de *in vivo* en *in vitro* werkzaamheden verder omlaag te schalen naar ML-I en DM-I niveau. Daarnaast verzoekt de aanvrager een verdere omlaagschaling naar D-I niveau voor werkzaamheden met varkens 7 dagen na huisvesting op DM-I niveau, op basis van nieuwe aangeleverde informatie over de biodistributie en uitscheiding van gg-VEEV replicons in muizen en varkens.

Omdat de aanvrager voornemens is in de toekomst additionele vaccinatie/challenge experimenten gebaseerd op het VEEV-repliconsysteem aan te vragen, waarbij gebruik gemaakt zal worden van andere proefdiersoorten, andere (virale) inserts en/of andere toedieningsroutes, is de COGEM gevraagd of haar advies ook van toepassing is op toekomstige werkzaamheden met hetzelfde productiesysteem.

2. *Venezuelan equine encephalitis virus*

VEEV behoort binnen de familie *Togaviridae* tot het genus *Alphavirus*.^{3,4} Het virus werd 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.⁵

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).^{6,7} De incidentie van encefalitis is minder dan vijf procent en de mortaliteit minder dan één procent.³

Kinderen die herstellen van encefalitis, kunnen hieraan neurologische stoornissen overhouden. Bij zwangere vrouwen kan een infectie leiden tot foetale afwijkingen en miskramen.⁶

VEEV wordt hoofdzakelijk door de muggensoorten *Culex melanoconion* spp. verspreid.³ Daarnaast zijn er gevallen beschreven waarbij onder laboratoriumomstandigheden aërogene verspreiding heeft plaatsgevonden.⁸ Het is onduidelijk in hoeverre aërogene verspreiding onder natuurlijke omstandigheden een rol speelt.

Er is op dit moment één levend verzwakt VEEV vaccin beschikbaar voor gebruik bij paarden. Dit vaccin, genaamd TC-83, is geproduceerd door de virulente stam *Trinidad donkey* 83 keer te passeren in hartcellen van cavia's. TC-83 wordt geproduceerd in Mexico en Colombia. In de Verenigde Staten is het alleen beschikbaar in geïnactiveerde vorm.⁸ Het wild-type VEEV is in de Regeling GGO ingedeeld als een virus van pathogeniteitsklasse 3. Werkzaamheden met de vaccinstam TC-83 kunnen volgens het Centers of Disease Control worden uitgevoerd op BSL-2.⁹

Het VEEV heeft een positief, enkelstrengs RNA genoom van ongeveer 11,4 kilobasen.^{4,8} Het genoom codeert voor zeven eiwitten, waarvan vier niet-structurele en drie structurele eiwitten. De niet-structurele eiwitten (nsP1 – nsP4) worden gecodeerd door genen in de 5' regio. In de 3' regio liggen de genen die coderen voor de structurele eiwitten (C, E1 en E2). Daarnaast bezit het genoom een zogenaamd packagingsignaal dat noodzakelijk is om het genomisch RNA (gRNA) in te pakken in een eiwitmantel. De eiwitmantel wordt gevormd door het capsid-eiwit (C) en wordt op zijn beurt omgeven door een lipidenmembraan. Dit membraan bevat twee glycoproteïnes (E1 en E2), die betrokken zijn bij de aanhechting en infectie van de gastheercel. De glycoproteïnes zijn daarmee direct van invloed op het gastheerbereik.⁴

3. Porcine epidemic diarrhea virus

PEDV behoort binnen de familie *Coronaviridae* tot het genus *Alphacoronavirus*.¹⁰ In 1972 is de ziekte die door PEDV veroorzaakt wordt voor het eerst beschreven in Groot-Brittannië. In de jaren daarna verspreidde het virus naar meerdere varkens-producerende landen in Europa. In 1982 is de ziekte voor het eerst in Azië gerapporteerd en vanaf 2013 is de ziekte aanwezig in Noord-Amerika.¹¹

PEDV veroorzaakt een darminfectie in varkens die gepaard gaat met diarree en een vermindering van de groei. Infectie met het virus kan zorgen voor een zeer hoge mortaliteit onder zogende biggen. Het virus wordt via mest overgedragen.¹¹ Het wild-type PEDV is in de Regeling GGO ingedeeld als een virus van pathogeniteitsklasse 2.

Het PEDV is omgeven door een lipidenmembraan en heeft een positief enkelstrengs RNA genoom. Het genoom bestaat uit tenminste 7 open leesramen en codeert voor 16 niet structurele genen, een 'accessory' gen en vier genen die coderen voor de structurele eiwitten 'spike' (S), 'membrane' (M), 'envelope' (E) en 'nucleocapsid' (N).¹¹ De eiwitten S, M en E zijn aanwezig in het lipidenmembraan en het S eiwit is bepalend voor het tropisme van het virus.

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens gg-VEEV-PEDV/GFP replicons te produceren door animale cellen te

transfecteren met gg-VEEV RNA dat is afgeleid van de avirulente VEEV vaccinstam TC-83, en twee helper RNA's. Het gg-VEEV replicon mist de genetische informatie voor de structurele eiwitten. Hiervoor in de plaats is de genetische informatie van het GFP eiwit of het S-eiwit van PEDV ingebracht. De helper RNA's bevatten de genetische informatie van het C-eiwit en de glycoproteïnes E1 en E2 van VEEV, welke nodig zijn om het gg-VEEV-PEDV/GFP replicon te produceren. De aanvrager wil de geproduceerde gg-VEEV-PEDV/GFP replicons vervolgens gebruiken om animale cellen (afkomstig van aap, hond, eend en vis) te infecteren. Daarnaast wil de aanvrager voor vaccinatie doeleinden varkens met de gg-replicons infecteren, en *in vitro* experimenten met de cellen van deze varkens uitvoeren. De gevaccineerde varkens worden 14 dagen na de vaccinatie 'gechallenged' met wildtype PEDV. Gedetailleerde informatie over de werkzaamheden staat beschreven in de COGEM adviezen uit 2016.^{1,2} De COGEM heeft in haar advies opgemerkt dat de werkzaamheden mogelijk omlaaggeschaald kunnen worden als de technische specificaties, de gebruikte controles en de wijze waarop de test op replicatiecompetent virus (RCV) gevalideerd is, overlegd worden. Deze zijn in de huidige vergunningaanvraag overlegd. Ook is er informatie overlegd over de biodistributie en uitscheiding van gg-VEEV replicons, om verdere omlaagshaling van werkzaamheden met dieren te onderbouwen.

4.1 Technische specificaties

De test op replicatiecompetent virus (RCV-test), ook wel 'in vitro cytopathic effect (CPE) assay' genoemd, is gebaseerd op een methode waarbij twee passages op Vero-cellen (een cellijn geïsoleerd van nierepithelcellen van een groene meerkat, *Chlorocebus* sp.) uitgevoerd worden. Bij de eerste passage worden Vero-cellen geïnoculeerd met 1×10^8 gg-VEEV replicons. Ook worden een negatieve en positieve controle meegenomen. Na één dag incubatie wordt er gecontroleerd op CPE, wat alleen mogelijk is wanneer er replicatiecompetent VEEV aanwezig is. Indien de batch positief is voor CPE, wordt de batch vernietigd en zal er geen tweede passage plaatsvinden. Voor de tweede passage wordt één dag na inoculatie het supernatant van de celkweek overgebracht naar nieuwe Vero-cellen. Deze cellen worden drie dagen geïncubeerd. Vervolgens wordt opnieuw gekeken of er CPE is opgetreden. Bij afwezigheid van CPE wordt de batch behouden, en bij eventuele aanwezigheid van CPE wordt de batch afgewezen.

4.2 Validatie RCV-test

De RCV-test is twee keer gevalideerd voor de 'limit of detection' (LOD). De LOD is één 'plaque forming unit' (PFU) specifiek voor RCV. Dit houdt in dat wanneer er één RCV aanwezig is, deze al kan worden aangetoond.

4.3 Biodistributie en uitscheiding

Bij varkens en muizen is onderzoek gedaan naar de uitscheiding van vergelijkbare gg-VEEV replicons waarin een gen van het *Swine influenza virus* (SIV) ingebracht is. Het VEEV-SIV vaccin is in verhoogde dosis (2×10^{10} VEEV RNA partikels per dier) intramusculair en intraveneus toegediend aan de varkens. Zowel in varkens als in muizen kon het gg-VEEV-SIV replicon niet gedetecteerd worden.

in serum, nasale, fecale en/of weefsel monsters die afgenomen zijn op verschillende (1, 3, 7, 10, 14-19, 21, 28 en 42) dagen na inoculatie.

5. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft in 2016 geadviseerd de *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met gg-VEEV-PEDV/GFP replicons in animale cellen en varkens in te schalen op respectievelijk ML-II en DM-II niveau.¹ De overweging voor deze inschaling is in een aanvullend advies nogmaals toegelicht.² Ten eerste is het productiesysteem van de gg-VEEV-PEDV/GFP replicons gebaseerd op de geattenueerde VEEV vaccinstam TC-83. Ten tweede zijn de gg-VEEV-PEDV/GFP replicons replicatie-incompetent door de afwezigheid van genen die coderen voor structurele eiwitten. Ten derde wordt de kans op het ontstaan van replicatiecompetent virus (RCV) zeer klein geacht. Dit vanwege een beperkte overlap tussen sequenties van het replicon RNA en de helper RNA's in het productiesysteem. Ook zijn de genen die coderen voor de structurele genen onderverdeeld over 2 helper RNA's, waardoor er twee onafhankelijke recombinatie gebeurtenissen noodzakelijk zijn voor het ontstaan van RCV. In het zeer onwaarschijnlijke geval van recombinatie zal er een RCV ontstaan die ten hoogste dezelfde pathogeniteit heeft als de TC-83 vaccinstam. Omdat er in de helper RNA's bepaalde mutaties zijn ingebracht, zal een eventueel gevormd RCV nog verder geattenueerd zijn en derhalve minder pathogeen zijn dan de vaccinstam TC-83.

6. Overweging en advies

6.1 Technische specificaties en validatie RCV-test

De aanvrager heeft aanvullende informatie aangeleverd over de technische specificatie en validatie van de RCV-test. De aanvrager stelt dat de producent 2060 batches heeft gecontroleerd en hierbij nooit RCV heeft ontdekt. De COGEM is van mening dat de specificaties voldoende zijn omschreven en de RCV-test goed gevalideerd is.

De COGEM is van mening dat met de gevalideerde RCV-test voldoende is aangetoond dat de kans op het ontstaan van RCV verwaarloosbaar klein is en de te gebruiken 'batches' met gg-VEEV-PEDV/GFP replicons vrij zijn van RCV. De COGEM stemt derhalve in met de voorgestelde omlaagschaling naar inperkingsniveau ML-I voor de werkzaamheden met animale cellen (de productie van gg-VEEV-PEDV/GFP replicons in cellen, de infectie van cellen met het replicon, en de handelingen met cellen afkomstig van geïnfecteerde varkens). Ook voor de handelingen met dieren (infectie met gg-VEEV-PEDV/GFP replicons) stemt de COGEM in met de voorgestelde omlaagschaling naar inperkingsniveau DM-I. De COGEM gaat ervan uit dat bij alle werkzaamheden de gebruikte cellen en/of dieren vrij zijn van VEEV en aan VEEV verwante virussen.

6.2 Biodistributie en uitscheiding

De aanvrager heeft gevraagd om een additionele omlaagschaling van inperkingsniveau DM-I naar D-I voor werkzaamheden met varkens 7 dagen na vaccinatie met gg-VEEV-PEDV/GFP replicons. Hiervoor heeft de aanvrager informatie aangeleverd over de biodistributie en uitscheiding van gg-VEEV replicons.

Na vaccinatie met het gg-VEEV-PEDV/GFP replicon zal het RNA in het cytosol van de doelwit cel tot expressie komen, waarbij de niet-structurele eiwitten (die het gg-VEEV-PEDV/GFP RNA repliceren) en het GFP of PEDV S-eiwit geproduceerd worden. Omdat er geen structurele eiwitten geproduceerd worden, kunnen er geen nieuwe virusdeeltjes gevormd worden en is er sprake van een 'single round of infection'. Het virale RNA wordt binnen drie tot vijf dagen afgebroken.¹² In muizen blijkt de expressie van antivirale genen van het immuunsysteem zes uur na infectie met VEEV replicons een hoogtepunt te bereiken.¹³ Virus specifieke cytotoxische T-cellen worden vanaf zes uur na infectie gestimuleerd om de virus-geïnfecteerde cellen op te ruimen.¹⁴ In muizen is na ongeveer vier dagen na toediening het virus geklaard uit serum en perifere weefsels.¹⁵ Volgens aanvrager tonen deze gegevens aan dat het gg-VEEV replicon zich niet kan verspreiden naar andere dieren en dat er geen reversie naar replicatiecompetent VEEV plaats heeft gevonden.

De aanvrager wil varkens inoculeren met 1×10^8 deeltjes gg-VEEV-PEDV/GFP op inperkingsniveau DM-I en vervolgens vanaf zeven dagen na vaccinatie de inperking verlagen naar niveau D-I. De COGEM is van mening dat de aanvrager voldoende bewijs heeft geleverd dat er bij deze dosering geen uitscheiding van gg-VEEV-PEDV/GFP op zal treden vanaf zeven dagen na inoculatie. De COGEM wijst erop dat gezien de gangbare 10-voudige veiligheidsmarge de inoculatie-experimenten ook veilig bevonden worden bij een dosering van 2×10^9 partikels. Gezien het bovenstaande stemt de COGEM in met de voorgestelde omlaagschaling naar inperkingsniveau D-I.

Challenge met PEDV

Veertien dagen na de initiële vaccinatie is de aanvrager voornemens om een 'challenge' experiment uit te voeren met wildtype PEDV. De COGEM acht de kans op recombinatie tussen het gg-VEEV-PEDV/GFP vaccin en wildtype PEDV verwaarloosbaar klein. Uit de aangeleverde informatie over de biodistributie en uitscheiding kan opgemaakt worden dat na 14 dagen het vaccin al is geklaard, en het vaccin en 'challenge' virus PEDV onmogelijk tegelijkertijd aanwezig kunnen zijn in het dier. Bovendien is de kans dat er door recombinatie een virus ontstaat met een pathogeniteit die groter is dan wildtype PEDV verwaarloosbaar klein, zoals reeds in het voorgaande COGEM advies is benoemd.^{1,2}

6.5 Uitbreiding werkzaamheden

De aanvrager heeft aangegeven in de toekomst experimenten gebaseerd op het gg-VEEV replicon systeem aan te vragen, waarbij gebruik gemaakt wordt van andere (virale) inserts, proefdiersoorten, en/of toedieningsroutes.

De COGEM is van mening dat de kans op het ontstaan van RCV bij het gebruik van andere (virale) inserts afhankelijk is van het gebruikte productiesysteem en niet van het gebruikte (virale) insert. De kans op het ontstaan van RCV is ook niet afhankelijk van de gebruikte proefdiersoort, of de toedieningsroute. De COGEM acht derhalve de kans op het ontstaan van RCV bij gebruik van andere (virale) inserts, proefdiersoorten, en/of toedieningsroutes, verwaarloosbaar klein.

De inschaling van het onderhavige advies is ook van toepassing op werkzaamheden met andere (virale) inserts, proefdiersoorten, en/of toedieningsroutes, 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. Indien er een substantieel hogere dosering of andere toedieningsroutes dan intramusculair en subcutaan gebruikt worden, zoals respiratoir of via aërosolen, dan acht de COGEM het noodzakelijk dat de aanvrager opnieuw onderzoek doet naar de biodistributie en uitscheiding voordat verdere omlaagschaling naar inperkingsniveau D-I mogelijk is.

De COGEM neemt aan dat er voorafgaand aan de toekomstige werkzaamheden een RCV-test uitgevoerd zal worden, welke negatief bevonden moet worden, en dat de gebruikte cellen en/of dieren vrij zijn van VEEV en aan VEEV verwante virussen.

De COGEM stemt in met de voorgestelde omlaagschaling van de werkzaamheden. 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. COGEM (2016). Inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met replicons afgeleid van Venezuelan equine encephalitis virus. COGEM advies GCM/160815-01
2. COGEM (2016). Onderbouwing van omlaagschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met gg-VEEV replicons. COGEM advies CGM/160906-02
3. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: Fields virology, 6th edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
4. 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
5. Weaver SC *et al.* (2004). Venezuelan Equine Encephalitis. Annu. Rev. Entomol. 49: 141-174
6. Griffin DE (2008). Togaviruses: Equine Encephalitic Viruses. In: Encyclopedia of Virology, third edition. Ed. Mahy BWJ & Van Regenmortel MHV, Elsevier Ltd.
7. Taylor KG & Paessler S (2013). Pathogenesis of Venezuelan equine encephalitis. Vet. Microbiol. 167: 145-150
8. Paessler S & Weaver SC (2009). Vaccines for Venezuelan equine encephalitis. Vaccine 27: D80-D85
9. Centers of Disease Control (2009). Geographic distribution of Chikungunya virus. www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/bmbl.pdf (bezocht: 15 februari 2017)
10. De Groot RJ *et al.* (2012) Family Coronaviridae. In Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
11. Lee C (2015). Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. Virol. J. 12: 193-209
12. Lundstrom K (2016). Replicon RNA viral vectors as vaccines. Vaccines 4: pii: E39
13. Konopka JL *et al.* (2009). Acute infection with *Venezuelan equine encephalitis virus* replicon particles catalyzes a systemic antiviral state and protects from lethal virus challenge. J. Virol. 83: 12432-12442
14. Bennet AM *et al.* (2001). An immunological profile of Balb/c mice protected from airborne challenge following vaccination with a live attenuated Venezuelan equine encephalitis virus vaccine. Vaccine 19: 337-347
15. Grieder FB *et al.* (1995). Specific restrictions in the progression of *Venezuelan equine encephalitis virus*-induced disease resulting from single amino acid changes in the glycoproteins. Virology 206: 994-1006