

De minister van Volkshuisvesting,
Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 3 juni 2009
KENMERK CGM/090603-01
ADVIES Werkzaamheden met VEE virus gebaseerde replicondeeltjes

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag met de titel
"Onderzoek naar het adjuverend effect van virusachtige deeltjes (alfavirus null-replicon
deeltjes), gebaseerd op het alfavirus *Venezuelan equine encephalitis virus*" van het Nederlands
Vaccin Instituut, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is verzocht te adviseren over handelingen met genetisch gemodificeerde virale vectoren die zijn gebaseerd op het *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEE virus). De aanvrager wil onderzoeken of de op het VEE virus gebaseerde vectordeeltjes (VRP's) de immuunreactie tegen het poliovaccin versterken. In het kader van dit onderzoek zullen de VRP's met het poliovaccin worden gemengd en aan ratten worden toegediend. De immuunreactie die dit in de ratten opwekt, zal aan de hand van bloedwaarden worden gevolgd. De aanvrager verzoekt de *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden op respectievelijk ML-II en DM-II niveau te mogen uitvoeren.

Uit het genoom van de VRP's zijn een aantal genen verwijderd. Hierdoor is de vector na infectie niet in staat nieuwe virusdeeltjes te vormen en zal de vector zich niet verder kunnen verspreiden. Tevens zijn enkele zogenaamde oppervlakte-eiwitten aangepast, waardoor de virulentie nog verder wordt beperkt.

De Amerikaanse producent controleert iedere geproduceerde batch met VRP's op de aanwezigheid van replicatiecompetente virussen (RCV's) die, in theorie, tijdens de productie kunnen ontstaan.

Gezien de gevoeligheid van de gebruikte detectiemethode en de biologische ingeperkte aard van de mogelijk aanwezige RCV's is de COGEM van mening dat de veiligheid voor mens en milieu gewaarborgd blijft als de voorgenomen *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden op respectievelijk ML-II en DM-II niveau uitgevoerd worden.

Tijdens de werkzaamheden op DM-II niveau kan evenwel niet uitgesloten worden dat de laboratoriummedewerker door aerogene verspreiding wordt blootgesteld aan de VRP's en eventueel aanwezige RCV's. Om de kans hierop te minimaliseren adviseert de COGEM enkele additionele maatregelen te nemen.

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 large loop followed by a horizontal stroke and a small vertical tick.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Inschaling van werkzaamheden met op het VEE virus gebaseerde replicondeeltjes

COGEM advies CGM/090603-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag getiteld ‘Onderzoek naar het adjuverend effect van virusachtige deeltjes (alfavirus null-replicon deeltjes), gebaseerd op het alfavirus *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEE virus)’. De aanvrager wil onderzoeken of de op het VEE virus gebaseerde null-replicon deeltjes (null-VRP’s) de immuunreactie tegen het poliovirusvaccin versterken. In het kader van dit onderzoek worden de null-VRP’s met het poliovaccin gemengd en aan ratten toegediend. De immuunreactie tegen het poliovirus zal vervolgens aan de hand van de aanwezige neutraliserende antilichamen in het serum van de ratten worden bepaald. De productie van de null-VRP’s vindt plaats bij Global Vaccines Inc. in de VS en valt niet onder deze vergunningaanvraag.

Alphavirussen

Het VEE virus behoort tot het genus *Alphavirus* binnen de familie *Togaviridae*.¹ Dit genus omvat 28 verschillende virussoorten.² Ze worden allen verspreid via insecten en behoren daarmee tot de zogenaamde arbovirussen (arthropodborne viruses). De verspreiding van deze virussen is tot bepaalde regio’s in de wereld beperkt.

De pathogene alphavirussen worden op basis van de ziekteverschijnselen die ze veroorzaken, verdeeld in twee groepen: de virussen die huiduitslag en artritis veroorzaken, en virussen die tot encefalitis (hersenontsteking) kunnen leiden. De laatste groep van virussen komt voornamelijk voor op het Amerikaanse continent. De andere virussen komen hoofdzakelijk voor in Europa, Azië en Afrika.³ Een groot deel van de alphavirussen is tot op heden niet geassocieerd met ziekte in mens of dier.

De infectiecyclus van alphavirussen speelt zich hoofdzakelijk af tussen muggen en knaagdieren of vogels. Mensen en grotere dieren, zoals paarden, kunnen geïnfecteerd raken, maar zijn zogenaamde ‘dead end hosts’. De infectie in deze gastheren is over het algemeen dusdanig van duur en aard dat ze niet bijdragen aan de verspreiding van het virus.³

Alphavirussen hebben een positief enkelstrengs RNA genoom van ongeveer 12.000 nucleotiden. Het genoom codeert zeven eiwitten, waarvan vier niet-structurele en drie structurele eiwitten. De niet-structurele eiwitten worden gecodeerd door genen op het 5’-

uiteinde van het genoom. Deze genen beslaan tweederde deel van het gehele genoom. Op het resterende deel, aan het 3'-uiteinde, liggen de drie structurele eiwitgenen.¹ Daarnaast bezit het genoom een zogenaamd 'packaging' signaal, dat noodzakelijk is om het genomisch RNA in te pakken in een eiwitmantel. De eiwitmantel wordt gevormd door het capsid eiwit (C) en wordt op zijn beurt omgeven door een lipidemembraan. 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. De virusdeeltjes hebben een icosahedrische vorm en zijn 60 tot 70 nm groot.^{1,3}

Tijdens de replicatie van alphavirussen dient het genomisch RNA als messenger RNA voor de niet-structurele eiwitten en als mal voor de synthese van een complementaire negatieve RNA streng. Deze negatieve RNA streng fungeert op zijn beurt als mal voor de synthese van nieuw genomisch RNA. Daarnaast wordt op basis van deze negatieve RNA streng ook messenger RNA gevormd voor de productie van de structurele eiwitten.⁴

VEE virus

Het VEE virus komt endemisch voor in de tropische en subtropische regio's van Centraal- en Zuid-Amerika, Mexico en Florida waar het paarden, ezels, muil dieren en mensen infecteert.³ Het virus wordt hoofdzakelijk door de muggensoorten *Culex melanoconion* spp. verspreid. Het virus en zijn muggenvector komen tot op heden niet voor in Nederland.

Een infectie met het VEE virus kan leiden tot encefalitis. Het virus is zeer infectieus, maar de letaliteit is relatief beperkt. Voor jonge kinderen is de letaliteit tussen de 20 en 30%, voor volwassenen minder dan 10%. De meeste patiënten herstellen binnen twee weken. Na een infectie treedt een zeer goede immuniteit op.

Naast de verspreiding van het VEE virus door insecten zijn er een aantal gevallen beschreven waarbij onder laboratoriumomstandigheden aëroge verspreiding heeft plaatsgevonden. Voordat laboratoriummedewerkers werden ingeënt tegen het VEE virus, zijn 150 gevallen van laboratoriuminfecties gerapporteerd.⁴ Het is onduidelijk in hoeverre dit onder natuurlijke omstandigheden een rol speelt. Het VEE virus is in de Regeling GGO ingedeeld als een virus van pathogeniteitsklasse 3.⁶

VEE gebaseerde replicon deeltjes

Het genoom van de null-VRP's bevat alleen de genen die coderen voor de niet-structurele eiwitten van het VEE virus. Ze missen derhalve het deel van het VEE virus genoom dat codeert voor de structurele eiwitten. Het genoom van de null-VRP's bevat geen transgen.

Tijdens de productie van de null-VRP's worden de genen die coderen voor de structurele eiwitten *in trans* aangeboden door middel van twee helper RNA's.^{7,8} De ene helper codeert voor het capsid-eiwit en de andere voor de twee glycoproteïnes. In de coderende sequentie voor de

glycoproteïnes zijn enkele mutaties aangebracht die het VEE virus dusdanig atteneren dat het als avirulent aangemerkt kan worden.^{9,11} De helper RNA's bevatten geen packagingsignaal en worden derhalve niet ingepakt in de null-VRP's. De null-VRP's zijn eenmalig in staat cellen te transduceren. Na transductie zal expressie van de niet-structurele eiwitten en replicatie van het null-VRP genoom plaatsvinden, maar door het ontbreken van de coderende sequentie voor de structurele eiwitten zullen geen nieuwe virusdeeltjes gevormd worden.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft al eerder geadviseerd over werkzaamheden met op alphavirus gebaseerde replicondeeltjes.^{12,13} Het betrof hierbij een chimeer replicon gebaseerd op delen van zowel het VEE virus als het *Sindbis virus* (SIN virus). Het genoom van dit VEE/SIN replicon bevatte het 5' uiteinde en de niet-structurele genen van het VEE virus. Het packaging signaal en het 3' uiteinde was afkomstig van het SIN virus. Ook bij deze replicon deeltjes werden de ontbrekende structurele genen tijdens de productie *in trans* aangeboden door toevoeging van twee helper RNA's. De helper RNA's codeerden voor de structurele eiwitten van het SIN virus.

Toentertijd achtte de COGEM de kans op het ontstaan van RCV bij de productie van deze VEE/SIN replicon deeltjes uiterst gering. Op basis van deze inschatting en de aard van de werkzaamheden heeft zij destijds de *in vitro* werkzaamheden met deze VEE/SIN replicondeeltjes op ML-II niveau ingeschaald.¹² De vaccinatie van rhesusapen met deze replicondeeltjes heeft zij ingeschaald op DM-II niveau onder de voorwaarde dat de apen negatief getest waren op de aanwezigheid van alphavirussen.¹³

Adviesvraag

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over de test die wordt gebruikt om de batch null-VRP's te controleren op de aanwezigheid van RCV's. Daarnaast is zij verzocht te adviseren over het inperkingsniveau waarop de *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met de null-VRP's uitgevoerd dienen te worden en de eventueel noodzakelijke aanvullende voorschriften.

Overwegingen en advies

Replicatiecompetent virus

In theorie zou tijdens het productieproces van de null-VRP's replicatiecompetent virus (RCV) kunnen ontstaan. Daarvoor moeten de ontbrekende structurele genen op de juiste manier in het genoom van de null-VRP's geïnsereerd worden. Om de kans op RCV te minimaliseren wordt gebruik gemaakt van een productiesysteem met twee helper RNA's. Door deze helper RNA's worden de ontbrekende structurele eiwitten (capside-eiwit en glycoproteïnes)

gecomplementeerd. Voor het ontstaan van RCV zijn derhalve twee onafhankelijke recombinatie gebeurtenissen noodzakelijk. De kans dat deze gebeurtenissen optreden is mede afhankelijk van de mate van sequentie homologie tussen het replicon en de helper RNA's.

In de wetenschappelijke literatuur wordt de kans op het ontstaan van RCV tijdens de productie van VEE replicon deeltjes met behulp van het twee helper RNA systeem klein geacht.^{8,9} Pushko en collega's hebben VRP's die met 'het twee helper RNA systeem' geproduceerd zijn op verschillende wijzen gecontroleerd op de aanwezigheid van RCV.⁸ Zelfs met de gevoeligste assay waarmee 1 RCV per milliliter aangetoond kan worden, werd in een batch van 10⁸ infectieuze VRP's per milliliter geen RCV aangetroffen.

Gezien het feit dat de sequentiehomologie tussen de helper RNA's en het genoom van de replicon beperkt is en het ontstaan van RCV met zeer gevoelige detectiemethode niet wordt waargenomen, acht de COGEM de kans op het ontstaan van RCV klein.

Als extra veiligheidsmaatregel zijn in de genen die coderen voor de glycoproteïnes enkele mutaties aangebracht, die het VEE virus sterk atteneren.^{10,11} Hierdoor zal een eventueel ontstaan RCV biologisch ingeperkt zijn en vergelijkbaar zijn met de avirulente vaccin stam V3014.^{8,11} Subcutane inoculatie van 2x10⁵ infectieuze deeltjes van deze vaccin stam geven in muizen geen ziekte verschijnselen.¹¹ Op basis van deze gegevens is de COGEM van mening dat het risico voor mens en milieu als gevolg van het ontstaan van RCV verwaarloosbaar klein is.

Test op RCV

De producent controleert tien procent van de geproduceerde batch null-VRP's op de aanwezigheid van RCV's door middel van twee passages op BHK cellen. De celkweken worden dagelijks gecontroleerd op cytopathogene effecten (CPE). Als geen CPE wordt waargenomen, wordt de batch beschouwd als RCV vrij. Het detectieniveau van deze test ligt op vijf RCV eenheden (PFU's). Dit betekent dat er in theorie tot 50 RCV's in de totale batch kunnen zitten, zonder dat dit wordt gedetecteerd.

De producent geeft aan dat er slechts incidenteel RCV's in de geproduceerde batch null-VRP's worden aangetroffen. Analyse van deze RCV laat zien dat de RCV's zijn ontstaan door zogenaamde niet-homologe recombinaties. De betreffende RCV's leiden na toediening in de hersenen van muizen niet tot symptomen van ziekte en lijken derhalve sterk geattenuerd.

Hoewel de COGEM de CPE-test op RCV's adequaat vindt en de gevoeligheid binnen de grenzen van hetgeen mogelijk is, kan zij niet uitsluiten dat een beperkt aantal RCV's in de batch aanwezig is. Zij merkt daarbij op dat de aangetroffen RCV's zijn ontstaan door niet-homologe recombinaties. De COGEM is van mening dat niet homologe recombinaties over het algemeen leidt tot een virus dat geattenuerd is ten opzichte van het uitgangsvirus. Bovendien zal het RCV gemuteerde glycoproteïnes bevatten, die het virus nog verder atteneren.

Met het oog op het maximale aantal RCV's (50) dat mogelijk in de batch null-PRV's aanwezig is en de attenuatie van de mogelijk aanwezige RCV's is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu als gevolg van deze eventueel aanwezige RCV's verwaarloosbaar klein zullen zijn.

Aerogene verspreiding

Hoewel het VEE virus over het algemeen wordt verspreid door muggen, kan het VEE virus onder laboratoriumomstandigheden ook aerogeen verspreid worden. De COGEM is van mening dat er een kans bestaat dat de toegediende null-VRP's tijdens of vlak na de injectie in ratten vrijkomen. Zij kan derhalve niet uitsluiten dat de medewerker als gevolg van aerogene verspreiding wordt blootgesteld aan null-VRP's. Aangezien de structurele genen in de te gebruiken null-VRP's ontbreken, kunnen er na een eventuele infectie echter geen nieuwe deeltjes gevormd worden. De kans op verdere verspreiding van de null-VRP's acht de COGEM derhalve verwaarloosbaar klein.

Gezien het beperkte aantal RCV's die er mogelijk in de oorspronkelijk batch aanwezig zijn en er in de dierproeven slechts een klein deel van deze batch wordt gebruikt, is de COGEM van mening dat de kans uiterst klein is dat een medewerker wordt blootgesteld aan RCV's. Zoals eerder aangegeven, is de COGEM van mening dat de RCV's sterk geattenuëerd zijn en qua virulentie vergelijkbaar zijn met de avirulente vaccin stam V3014. Zij kan evenwel niet uitsluiten dat een RCV zal repliceren in een humane gastheer. Vanwege het feit dat de mens wordt beschouwd als 'dead end host' die niet bijdraagt aan de verspreiding van het VEE virus en het feit dat de muggenvector van dit virus niet in Nederland aanwezig is, is de COGEM echter van mening dat de kans op verdere verspreiding van eventueel aanwezige RCV's in het milieu verwaarloosbaar klein is.

Complementatie van of recombinitie met een verwant virus

Een eventueel risico bij het vaccineren van proefdieren wordt gevormd door het optreden van recombinitie van de virusvector met in de dieren aanwezige wildtype virussen. Daarnaast zou er complementatie kunnen optreden, waarbij een wildtype virus de verdere verspreiding van de virale vector faciliteert.

Het VEE virus en verwante virussen uit het zogenaamde VEE-complex komen niet in Europa voor. De kans dat in Nederland gefokte ratten geïnfecteerd zijn met het VEE virus of een nauw verwant virus acht de COGEM verwaarloosbaar klein. Bovendien treedt bij een superinfectie van een met een alphavirus geïnfecteerde cel geen replicatie op van het tweede virus. De COGEM is derhalve van mening dat de kans op complementatie verwaarloosbaar klein is.

Recombinatie tussen verschillende alphavirussen onder *in vitro* omstandigheden is beschreven.^{14,15} De COGEM merkt daarbij echter op dat de replicatie-efficiëntie van de ontstane virussen sterk verlaagd is en de virussen geattenuëerd zijn in proefdieren.^{16,17} In combinatie met het feit dat de muggenvector, het VEE virus en verwante virussen uit het VEE-complex niet in Nederland voorkomen, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er een recombinant virus ontstaat dat zich in het milieu kan verspreiden.

De aanvrager is van plan de dieren te vaccineren met een combinatie van null-VRP's en een poliovirusvaccin. Aangezien beide virussen niet verwant zijn en het poliovirus geïnactiveerd wordt met formaldehyde acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er enige interactie tussen beiden zal optreden, waardoor een recombinant virus zich in het milieu zou kunnen verspreiden.

Advies

In de Regeling GGO wordt het VEE virus ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3. Op basis van bovenstaande overwegingen adviseert de COGEM de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden met de null-VRP's omlaag te schalen en uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. Op dit inperkingsniveau en onder navolging van de voor dit niveau geldende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn. De *in vivo* werkzaamheden in ratten adviseert de COGEM op DM-II inperkingsniveau uit te voeren. Om de kans op een eventuele blootstelling van de medewerker aan de null-VRP's of RCV's als gevolg van aerogene verspreiding te minimaliseren, adviseert zij op DM-II niveau de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- de dieren dienen gehuisvest te worden in filtertopkooien,
- open handelingen, waaronder alle handelingen waarbij een besmette filtertopkooi geopend wordt, dienen in een klasse II veiligheidskabinet uitgevoerd te worden,
- het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht.

Onder navolging van deze aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu als gevolg van de beschreven handelingen met de null-VRP's verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Weaver SC *et al.* (2000). *Family Togaviridae*. In: Virus taxonomy, Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Edited by Van Regenmortel, M.H.V. *et al.* Academic Press, San Diego. 879-889

2. Pialoux G *et al.* (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis* 7:319-327
3. Griffin DE (2001). Alphaviruses. In: *Fields Virology*. Edited by: Knipe MD and Howley PM. Philadelphia: 917-962
4. Schlesinger S and Schlesinger MJ (2001). *Togaviridae*: The viruses and their replication. In: *Fields Virology*. Edited by: Knipe MD and Howley PM. Philadelphia: 895-916
5. Pratt WD *et al.* (1998). Use of telemetry to assess vaccine-induced protection against parental and aerosol infection of Venezuelan equine encephalitis virus in non-human primates. *Vaccine* 16:1056-1064
6. COGEM (1998). Regeling genetisch gemodificeerde organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze regeling
7. Frolov I *et al.* (1996). Alphavirus based expression vectors: strategies and applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:11371-11377
8. Pushko P *et al.* (1997). Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes *in vitro* and immunization against heterologous pathogens *in vivo*. *Virology* 239:389-401
9. Davis NL *et al.* (2000). Vaccination of macaques against pathogenic simian immunodeficiency virus with Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. *J. Virol.* 74:371-378
10. Davis NL *et al.* (1991). Attenuating mutations in the E2 glycoprotein gene of Venezuelan equine encephalitis virus: construction of single and multiple mutants in a full length cDNA clone. *Virology* 183:20-31
11. 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
12. COGEM (2004). Constructie en productie van alphavirusvectoren. (CGM/040212-02)
13. COGEM (2006). Vaccinatie van apen met recombinante chimere alphavirusvectoren ten behoeve van vaccinonderzoek. (CGM/060314-01)
14. Strauss EG and Strauss JH. (1997). Recombination in alphaviruses. *Semin. Virol.* 8: 85-94
15. Schoepp RJ *et al.* (2002). Recombinant chimeric western and equine encephalitis viruses as potential vaccine candidates. *Virology* 302: 299-308
16. Paessler S *et al.* (2003). Recombinant sindbis/Venezuelan equine encephalitis virus is highly attenuated and immunogenic. *J. Virol.* 77: 9278-9286
17. Kuhn RJ *et al.* (1996). Chimeric sindbis-ross viruses to study interactions between alphavirus nonstructural and structural regions. *J. Virol.* 70: 7900-7909