

Aan de staatssecretaris van Openbaar Vervoer en Milieu
Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat
Ch.A. Jansen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 13 november 2024
KENMERK CGM/241113-01
ONDERWERP Advies omlaagschaling werkzaamheden met gg-VSIV

Geachte heer Jansen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over het dossier IG 24-108_2.8-000 getiteld 'Production of modified Vesicular Stomatitis Virus', ingediend door Batavia Biosciences B.V. te Leiden, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-)Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV), waarvan het G-eiwit is vervangen door glycoproteïnes van het Sindbis virus (SINV) (gg-VSIVΔG/SINV). De aanvrager verzoekt de werkzaamheden uit te mogen voeren op ML-II, met inbegrip van enkele aanvullende voorschriften.

VSIV veroorzaakt ziekte in vee met symptomen die lijken op mond- en klauwzeer, en is als klasse 3 pathogeen geclassificeerd. SINV kan verschillende vertebraten, waaronder vogels, infecteren en is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. Door de aangebrachte modificaties in het te gebruiken gg-VSIVΔG/SINV is naar verwachting het tropisme beperkt en de pathogeniteit verminderd ten opzichte van wildtype VSIV. De COGEM is van oordeel dat het gg-VSIVΔG/SINV verzwakt is ten opzichte van wildtype VSIV. Zij kan op basis van de huidige beschikbare informatie niet uitsluiten dat dieren die vatbaar zijn voor zowel SINV als VSIV, geïnfecteerd kunnen worden met gg-VSIVΔG/SINV, waarbij verdere verspreiding mogelijk is. Daarnaast is op basis van de aangeleverde informatie niet geheel uit te sluiten dat recombinatie en reversie naar wildtype VSIV is opgetreden tijdens het productieproces.

Alles in overweging nemende, adviseert de COGEM om de werkzaamheden met gg-VSIVΔG/SINV in te schalen op ML-II, mits kan worden uitgesloten dat recombinatie is opgetreden, open handelingen plaatsvinden in een veiligheidskabinet van klasse II, handschoenen tot over de mouwen gedragen worden en contact met gevoelige diersoorten tot 3 dagen na de werkzaamheden vermeden wordt.

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.

- Drs. Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal

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

Inschaling van werkzaamheden met gg-VSIV gepseudotypeerd met glycoproteïnen van het Sindbis virus

COGEM advies CGM/241113-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg) Vesicular Stomatitis Indiana virus (VSIV) waarbij het G-eiwit volledig is vervangen door glycoproteïnes van het Sindbis virus (SINV). De aanvraag is afkomstig van Batavia Biosciences B.V. te Leiden (IG 24-108). De aanvrager verzoekt deze werkzaamheden uit te mogen voeren op inperkingsniveau ML-II met inachtneming van enkele aanvullende voorschriften.

2. Achtergrondinformatie over de gebruikte virussen

2.1 Achtergrondinformatie Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV)

Het Vesicular stomatitis Indiana virus (*Vesiculovirus indiana*, VSIV, ook wel VSV genoemd) behoort binnen de familie van de *Rhabdoviridae* tot het genus *Vesiculovirus*.¹

VSIV heeft als primaire gastheren knaagdieren, vee, varkens en paarden.² Het virus is enzoötisch in de Verenigde Staten, Midden-Amerika en een deel van Zuid-Amerika, en veroorzaakt vesiculaire stomatitis bij runderen, schapen, varkens en paarden. Deze ziekte is besmettelijk, wordt gekenmerkt door blaasjes op de tong, het tandvlees, de uiers en de hoeven van de dieren, en lijkt sterk op mond-en-klauwzeer.^{3,4} Een uitbraak van VSIV kan tot grote economische schade leiden. Het virus wordt overgedragen door insecten, via direct contact met wondjes op de huid van besmette dieren, of via inhalatie van virus bevattende aërosolen.^{3,4,5}

VSIV kan ook mensen infecteren. Infectie vindt vaak plaats via blootstelling aan geïnfecteerde dieren. Ook is infectie door blootstelling aan het virus in het laboratorium beschreven.^{2,4} De humane infecties verlopen meestal zonder klinische verschijnselen, hoewel sommige mensen griepachtige symptomen ontwikkelen.^{2,6} In zeer uitzonderlijke gevallen kan encefalitis optreden na infectie met VSIV.⁷ Verspreiding van mens naar mens is niet gerapporteerd.⁸

VSIV heeft een niet-gesegmenteerd negatief enkelstrengs RNA-genoom. De virusdeeltjes worden omhuld door een membraan.^{4,6} Het genoom codeert voor vijf eiwitten: het 'nucleoprotein' (N), het 'phosphoprotein' (P), het 'large protein' (L), het 'matrixprotein' (M) en het 'glycoprotein' (G). De N-, L- en P-eiwitten vormen een RNA-afhankelijk RNA-polymerase complex dat verantwoordelijk is voor zowel virale transcriptie als replicatie. Het G-eiwit zit in het membraan verankerd en is betrokken bij de hechting aan en fusie met de gastheercel. Het M-eiwit speelt een belangrijke rol in de constructie van het virus, remming van de genexpressie van de gastheer, virus 'budding' en apoptose (geprogrammeerde celdood).^{4,9,10} VSIV kent een breed celtropisme. De 'low density lipoprotein' receptor (LDLR) en leden van de LDLR-familie zijn geïdentificeerd als de cellulaire receptoren voor VSIV-infectie.¹¹

2.2 Achtergrondinformatie Sindbis virus (SINV)

Sindbis virus (*Alphavirus sindbis*, SINV) is een RNA-virus behorende tot de familie *Togaviridae* en het genus *Alphavirus*.^{12,13} Alphavirussen hebben een breed gastheerbereik, waaronder vogels, zoogdieren en insecten.¹⁴ 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.¹³ 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.¹⁵ In de 3'-regio liggen de genen die coderen voor de structurele eiwitten (C, E1 en E2).¹² 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 (E2) en infectie (E1) van de gastheercel. De glycoproteïnen zijn daarmee direct van invloed op het gastheerbereik.¹³

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 is veel bestudeerd in muizen, waar het virus acute encefalitis kan veroorzaken.¹²

Mensen kunnen als gevolg van een muggenbeet geïnfecteerd raken met SINV en worden beschouwd als een ‘dead-end’ gastheer.^{16,17} Er zijn geen aanwijzingen dat SINV van mens-op-mens kan worden overgedragen. Onder laboratoriumomstandigheden kan SINV besmetting door aerosolen niet geheel worden uitgesloten.¹⁸

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.¹²

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens om infectie- en productieactiviteiten uit te voeren met replicatiecompetente gg-VSIV. Deze activiteiten zullen uitgevoerd worden voor een derde partij die de gg-VSIV zal gebruiken in preklinische en klinische studies met als doel om een oncolytische therapie te ontwikkelen ter behandeling van hepatocellulair carcinoom.

In deze gg-VSIV is het gen coderend voor het G-eiwit van VSIV vervangen door een cassette coderend voor envelop-eiwitten E3, E2, 6K en E1 van SINV (VSIVΔG/SINV). Hierbij gaat het bij E2 om een gemodificeerd glycoproteïne. Het E2-eiwit is verantwoordelijk voor receptorbinding van het virus met de gastheercel.¹⁹ In het gemodificeerde E2-eiwit zijn de aminozuren op positie 72 en 73 verwijderd en vervolgens is tussen aminozuurpositie 71 en 74 (het receptor bindende domein van het eiwit) een ‘nanobody’ geïnsereerd die gericht is op de humane GPC3-receptor.^{19,20} GPC3 is een receptor die tot overexpressie komt in hepatocellulaire carcinomen.^{21,22} De aanpassingen in het E2-eiwit resulteren in een tropisme verandering naar humane cellen met de GPC3-receptor. Daarnaast wordt een ‘riboswitch’ toegepast op de 3'UTR, gebaseerd op een beta-catenine aptameer. Door deze ‘riboswitch’ wordt expressie

van de envelop-eiwitten gecontroleerd door de aanwezigheid van bepaalde chemische stoffen die in kankerweefsel tot overexpressie komen.^{23,24}

Voor de constructie van VSIVΔG/SINV is gebruik gemaakt van vijf plasmiden en 293T-cellen die na infectie met vaccinia virus T7 RNA-polymerase tot expressie brengen. Eén plasmide bevat de codering voor VSIVΔG/SINV, de andere vier plasmiden bevatten de codering voor de VSIV-eiwitten N, P, G of L. Eiwitexpressie vindt plaats onder controle van een T7 RNA-polymerase promotor. De constructie van VSIVΔG/SINV valt niet onder de vergunningaanvraag. Met de verkregen replicatie-competente gg-virusdeeltjes zullen Verocellen of HEK293(T)-cellen geïnfecteerd gaan worden. Ook zal het gg-virus kleinschalig geproduceerd worden (<10L) en in een bioreactor. Daarnaast zal het virus gezuiverd en gekarakteriseerd worden. Deze activiteiten vallen wél onder de vergunningaanvraag.

De aanvrager verzoekt de werkzaamheden in te schalen op ML-II, met de volgende aanvullende voorschriften:

- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen;
- Open handelingen worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet van klasse II;
- Alle medewerkers van het laboratorium mogen geen contact hebben met varkens, paarden en herkauwers tot 3 dagen na werkzaamheden met VSIVΔG/SINV.

Bureau GGO stelt voor de activiteiten uit te voeren onder toepassing van de bovenstaande voorschriften en daarnaast onder toepassing van de standaard aanvullende voorschriften voor activiteiten met een bioreactor:

- De bioreactor heeft geen grotere effectieve inhoud dan 100 liter;
- De bioreactor is zo geconstrueerd, dat de verspreiding van genetisch gemodificeerde organismen is beperkt;
- De bemonstering van de bioreactor, de toevoeging van materiaal aan de bioreactor en de overdracht van materiaal naar een ander systeem, geschiedt zodanig dat de vorming en verspreiding van aerosolen en de besmetting van externe oppervlakken worden vermeden;
- De lozing van de inhoud van de bioreactor geschiedt nadat de eventueel aanwezige genetisch gemodificeerde organismen volgens een gevalideerde methode zijn geïnactiveerd.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft VSIV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3 omdat het virus gemakkelijk tussen dieren wordt overgedragen en de consequenties van een ontsnapping naar het milieu aanzienlijk kunnen zijn.²⁵ SINV is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.²⁶

De COGEM heeft meerdere malen geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met VSIV(ΔG) chimereën met heterologe oppervlakte-eiwitten. In de adviezen over gg-VSIV waarbij genen geïnserieerd zijn die coderen voor heterologe oppervlakte-eiwitten, achtte de COGEM in enkele gevallen de onderbouwing voor de attenuatie van de gg-VSIV niet voldoende om omlaagschaling naar ML-II mogelijk te maken,^{25,27} of waren de validatietestgegevens ontoereikend om uit te sluiten of recombinatie en reversie naar wildtype op kon treden tijdens de productie.^{28,29}

In verschillende verzoeken tot omlaagschaling van gg-VSIV, waarbij het gen coderend voor het G-eiwit vervangen werd door het gen coderend voor het G-eiwit van het Ebolavirus (gg-VSIV-ZEBOV)³⁰, het GPC-eiwit van het Lassa virus (VSVΔG/LASVGPC)³¹, of het S-eiwit van verschillende coronavirussen (gg-VSIVΔG-CoV-S),³² achtte de COGEM het betreffende gg-VSIV voldoende geattenuëerd ten opzichte van wildtype VSIV om omlaagschaling van ML-III naar ML-II niveau te rechtvaardigen, onder voorwaarde van enkele aanvullende voorschriften.

Ook heeft de COGEM positief geadviseerd over de omlaagschaling van werkzaamheden met een gg-VSIV waarin de sequentie van het G-eiwit gedeleteerd is, en het virusdeeltje gepseudotypeerd is met het glycoproteïne van het Ebolavirus of Marburgvirus (en dus niet de coderende sequentie van deze oppervlakte-eiwitten bevat).³³

5. Overweging

De aanvrager is voornemens om werkzaamheden uit te voeren met replicatiecompetent chimeer gg-VSIV waarvan de sequentie van het VSIV-G-eiwit is vervangen door de sequenties van glycoproteïnes van SINV (VSIVΔG/SINV). Voor de overweging van de inschaling van de werkzaamheden met gg-VSIVΔG/SINV spelen een aantal aspecten een rol, die hieronder puntsgewijs zullen worden behandeld.

5.1 Attenuatie van gg-VSIVΔG/SINV

De aanvrager is van mening dat het gg-virus geattenuëerd is ten opzichte van wildtype VSIV. Ter onderbouwing hiervoor verwijst de aanvrager naar verschillende *in vitro* en *in vivo* studies met vergelijkbare gg-VSIVΔG-virussen waarbij de coderende sequentie van de envelopeiwitten van verschillende virussen in het VSIV-ΔG genoom zijn geïnsereerd, en welke onderzocht zijn als potentieel vaccin of oncolytische therapie.^{34,35,36} Deze en andere *in vitro* en *in vivo* studies met verschillende gg-VSIVΔG tonen aan dat gg-VSIVΔG een verminderd replicerend vermogen heeft, en verminderd pathogeen is ten opzichte van wildtype VSIV.^{34,35,36,37,38} Ook in verschillende vaccinstudies bij mensen met gg-VSIV-ΔG-ZEBOV-GP (een gg-VSIVΔG met dezelfde backbone als VSIVΔG/SINV die de coderende sequentie van het glycoproteïne (GP) van het Zaïre ebolavirus bevat) is het vaccin veilig gebleken en zijn alleen milde bijwerkingen opgetreden zoals vermoeidheid, hoofdpijn, spierpijn, artralgie.³⁹

De aanvrager heeft ook *in vitro* gegevens overlegd waarin de in onderhavige aanvraag te produceren gg-VSIVΔG/SINV getest is in humane foetale longcellen (WI-38) en gezonde muiscellen (NIH/3T3) en gebaseerd op cytopathische effecten minder replicatie laat zien ten opzichte van wildtype VSIV. Experimentele gegevens over de attenuatie van de in de onderhavige aanvraag te produceren gg-VSIVΔG/SINV *in vivo* zijn niet beschikbaar.

Het voorgaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat gg-VSIVΔG/SINV geattenuëerd is ten opzichte van wildtype VSIV.

5.2 Tropisme van gg-VSIVΔG/SINV

In de gg-VSIVΔG/SINV virussen zullen de envelop-eiwitten E3, E1, 6K en een gemodificeerd E2-eiwit van SINV in het membraan van de virusdeeltjes worden opgenomen en zal het tropisme van het virus veranderen ten opzichte van het wildtype VSIV. VSIV kan vrijwel alle humane cellen, en daarnaast ook

verschillende andere organismen infecteren.⁴⁰ De COGEM is van oordeel dat het aannemelijk is dat het tropisme van gg-VSIVΔG/SINV beperkter zal zijn dan dat van wildtype VSIV door de afwezigheid van het G-eiwit, dat voor een breed tropisme zorgt. Ook SINV heeft een breed tropisme en kan verschillende vertebraten, waaronder vogels, infecteren en daarnaast ook vele verschillende celtypes infecteren. Echter, gg-VSIVΔG/SINV bevat een gemodificeerde E2-eiwit waarin een ‘nanobody’ is geïnsereerd gericht op de humane GPC3-receptor. Door deze modificatie wordt het tropisme geacht te veranderen naar humane cellen met de GPC3-receptor. Daarnaast wordt een ‘riboswitch’ toegepast op de 3’UTR, waardoor expressie van de envelop-eiwitten gecontroleerd wordt door de aanwezigheid van bepaalde chemische stoffen die in kankerweefsel tot overexpressie komen. Hierdoor is het aannemelijk dat infectie van primaire gastheren beperkt zal zijn.

Ter onderbouwing van het veranderde tropisme van VSIVΔG/SINV overlegt de aanvrager twee wetenschappelijke publicaties over vergelijkbare gg-VSIVΔG virussen waarbij het E2-eiwit van SINV gemodificeerd is om de Her2/neu-receptor te binden en die onderzocht zijn als potentiële oncolytische therapie voor borstkanker. Deze twee *in vitro* studies laten zien dat het gg-VSIVΔG selectief cellen infecteert die de Her2/neu-receptor tot expressie brengen.^{41,42} Ook heeft de aanvrager experimentele gegevens overlegd van een *in vitro* studie met gg-VSIVΔG/SINV specifiek voor de GPC3-receptor. In deze studie zijn humane foetale longcellen (WI-38) en gezonde muiscellen (NIH/3T3) blootgesteld aan verschillende concentraties gg-VSIVΔG/SINV en wildtype SINV. Foetale longcellen werden in deze studie gekozen als ‘off-target’ model, omdat de humane GPC3-receptor naast op kankercellen ook tijdens de embryonale ontwikkeling tot expressie komt op cellen.²¹ In de foetale longcellen had gg-VSIVΔG/SINV een minimaal effect op de levensvatbaarheid van de cellen vergeleken met cellen geïnfecteerd met wildtype VSIV. In NIH/3T3-muiscellen had gg-VSIVΔG/SINV geen negatief effect op levensvatbaarheid, maar lieten cellen geïnfecteerd met wildtype VSIV bij lage concentraties al een cytopathisch effect zien.

De COGEM is van oordeel dat deze studies laten zien dat gg-VSIVΔG/SINV waarschijnlijk een beperkt tropisme heeft ten opzicht van wildtype SINV of VSIV. Echter, data die de specificiteit van gg-VSIVΔG/SINV voor de humane de GPC3-receptor *in vivo* aantoon, ontbreken. Hierdoor is het gastheerbereik en celtropisme van gg-VSIVΔG/SINV niet met zekerheid vast te stellen. Het is derhalve niet geheel uit te sluiten dat gg-VSIVΔG/SINV meerdere diersoorten zou kunnen infecteren.

5.3 Verspreiding in het milieu

Zoals eerder in het advies is aangegeven, is VSIV een diervirus. VSIV kan mensen infecteren, maar transmissie tussen mensen is tot op heden niet gerapporteerd. Aangenomen wordt dat de aangeboren immuniteit (onder meer door de productie van interferon-alfa en -beta) verantwoordelijk is voor het zelf-limiterende karakter van een infectie met VSIV.^{39,43} Om die reden is het niet aannemelijk dat de transmissie van het gg-VSIVΔG/SINV tussen mensen mogelijk zal zijn, wanneer het oppervlakte-eiwit van VSIV is vervangen voor envelopeiwitten van SINV. Daarnaast is in gg-VSIVΔG/SINV een ‘nanobody’ ingebracht en een riboswitch toegepast waardoor het celtropisme in theorie beperkt zou zijn tot hepatocellulaire carcinomen. Ook voor het ebolavaccin rVSIVΔG-ZEBOV-GP, waarbij de receptor voor het ingebrachte Ebolavirus GP-eiwit alleen voorkomt in mensen en apen, is geen transmissie van mens op mens

waargenomen.³⁹ De COGEM kan niet uitsluiten dat een eventueel besmette medewerker infectieus virus in het milieu zal uitscheiden. Daarnaast is het niet geheel uit te sluiten dat gg-VSIVΔG/SINV meerdere diersoorten zou kunnen infecteren. De aanvrager heeft de volgende aanvullende maatregelen voorgesteld om verspreiding tegen te gaan: open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet van klasse II, er worden handschoenen tot over de mouwen gedragen en contact met gevoelige diersoorten wordt tot 3 dagen na de werkzaamheden vermeden. De COGEM is van oordeel dat deze maatregelen voldoende zijn om te voorkomen dat de medewerker besmet raakt met het gg-VSIVΔG/SINV en om eventuele verspreiding in het milieu te minimaliseren.

5.4 Recombinatie tijdens het productieproces

Tijdens het productieproces van gg-VSIVΔG/SINV is gebruik gemaakt van een plasmide waarop de G-sequentie van VSIV aanwezig is. Ook wordt het virus tijdens het productieproces gepasseerd op HEK293T-cellen welke gecomplementeerd zijn met VSIV-G. Wanneer er overlappende sequenties aanwezig zijn, bestaat het risico dat er tijdens de productie recombinatie optreedt tussen de sequenties op het VSIVΔG/SINV plasmide en het plasmide dat de sequentie van het VSIV-G-eiwit bevat. Recombinatie zou kunnen leiden tot reversie naar wildtype VSIV. Informatie over de aanwezigheid van eventuele overlappende sequenties tijdens het productieproces van gg-VSIVΔG/SINV is niet aanwezig in de vergunningaanvraag.

De COGEM merkt op dat recombinatie tussen viraal RNA van eventueel aanwezig wildtype VSIV in de gebruikte cellijnen en DNA (plasmide met VSIVΔG/SINV) niet zal plaatsvinden. Recombinatie tussen viraal RNA en mRNA afkomstig van het plasmide is zeer onwaarschijnlijk. Recombinatie van negatieve (ss)RNA virussen is zeer zeldzaam.⁴⁴ De *Rhabdoviridae* staan nauwelijks bekend om het ontstaan van recombinanten. Ook is recombinatie tussen verschillende vesiculo stomatitis virusstammen tot op heden nog niet bekend.^{45,46}

De aanvrager heeft gegevens overlegd waarin door middel van ‘nanopore sequencing’ wordt aangetoond dat het gen coderend voor het G-eiwit niet aanwezig is in gg-VSIVΔG/SINV. Echter, dit wordt gedaan voordat seriële passages van het virus op HEK293- en Verocellen worden uitgevoerd (in afwezigheid van het G-eiwit) waardoor eventueel ontstane wildtype VSIV-deeltjes waarschijnlijk nog niet detecteerbaar zijn op het moment van testen. Daarnaast merkt de COGEM op dat gegevens ontbreken die de gevoeligheid en specificiteit van de gebruikte methode aantonen. Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat recombinatie tijdens de productie van gg-VSIVΔG/SINV niet kan worden uitgesloten en dat aanvullende gegevens over de gevoeligheid van de ‘nanopore sequencing’ moeten worden aangeleverd en het testen moet plaatsvinden na seriële passage, of aangetoond moet worden dat er geen sequentieoverlap is tussen VSIVΔG/SINV- en G-sequenties tijdens het productieproces.

6. Advies

De COGEM is van oordeel dat het gg-VSIVΔG/SINV voldoende geattenuëerd is ten opzichte van het wildtype VSIV om omlaagschaling van de voorgenomen werkzaamheden van ML-III naar ML-II niveau te rechtvaardigen.

De COGEM merkt op dat op basis van de aangeleverde gegevens recombinatie tijdens de productie van gg-VSIVΔG/SINV niet kan worden uitgesloten. Zij is van oordeel dat de werkzaamheden met gg-VSIVΔG/SINV op ML-II plaats kunnen vinden, mits aanvullende gegevens over de gevoeligheid van de ‘nanopore sequencing’ worden aangeleverd en het testen plaatsvindt na seriële passage, of aangetoond wordt dat er geen sequentieoverlap is tussen VSIVΔG/SINV- en G-sequenties tijdens het productieproces.

De COGEM kan niet uitsluiten dat een eventueel besmette medewerker infectieus virus in het milieu zal uitscheiden. De aanvrager heeft de volgende aanvullende maatregelen voorgesteld om verspreiding tegen te gaan:

- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen;
- Open handelingen worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet van klasse II;
- Alle medewerkers van het laboratorium mogen geen contact hebben met varkens, paarden en herkauwers tot 3 dagen na werkzaamheden met VSIVΔG/SINV.

De COGEM is van oordeel dat deze aanvullende maatregelen voldoende zijn om te voorkomen dat de medewerker besmet raakt met het gg-VSIVΔG/SINV en om eventuele verspreiding in het milieu te minimaliseren.

Met betrekking tot de bioreactor gelden de standaard aanvullende voorschriften voor activiteiten met een bioreactor op ML-II. De COGEM wijst erop dat in het geval van een incident met de bioreactor, bijvoorbeeld bij lekkage, moet worden voorkomen dat de gg-VSIVΔG/SINV de ruimte verlaat en op deze manier in het milieu terecht kan komen. Om dit te voorkomen moet de vloeistof opgevangen en geïnactiveerd kunnen worden, hetzij door bijvoorbeeld gebruik van lekbakken of vloeistofdrempels in de werkruimte.

Alles in overweging nemende, is de COGEM is van oordeel dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn op ML-II mits gegevens overlegd worden waaruit blijkt dat de aanwezigheid van recombinanten uitgesloten is, en de bovengenoemde aanvullende voorschriften worden nagevolgd.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://ictv.global/taxonomy> (bezocht: 7 november 2024)
2. Lichty BD *et al.* (2004). Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. Trends Mol. Med. 10: 210-216
3. Letchworth GJ *et al.* (1999). Vesicular stomatitis. Vet. J. 157: 239-60
4. Lyles DS *et al.* (2013). *Rhabdoviridae*. In: Fields Virology, 6th ed.. Ed. Knipe MD & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
5. Rozo-Lopez P *et al.* (2018). Vesicular stomatitis virus transmission: A comparison of incriminated vectors. Insects 9: 190
6. International Committee on Taxonomy of Viruses. Genus: *Vesiculovirus*. <https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae/vesiculovirus> (bezocht: 4 november 2024)
7. Quiroz E *et al.* (1988). A human case of encephalitis associated with vesicular stomatitis virus (Indiana serotype) infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 39: 312-314

8. Public Health Agency of Canada (2012). www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/vesicular-stomatitis-virus.html (bezocht: 4 november 2024)
9. Ahmed M *et al.* (2003). Ability of the matrix protein of vesicular stomatitis virus to suppress beta interferon gene expression is genetically correlated with the inhibition of host RNA and protein synthesis. *J. Virol.* 77: 4646-4657
10. von Kobbe C *et al.* (2000). Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell gene expression by targeting the nucleoporin Nup98. *Mol. Cell* 6: 1243-1252
11. Finkelshtein D *et al.* (2013). LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 110: 7306-7311.
12. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: *Fields virology*, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
13. 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
14. Smerdou C & Liljeström P (1999). Two-helper RNA system for production of recombinant *Semliki Forest virus* Particles. *J. Virol.* 73: 1092-1098
15. Rupp JC *et al.* (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J. Gen. Virol.* 96: 2483-2500
16. 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
17. MacLachlan NJ & Dubovi EJ (2016). Chapter 28 *Togaviridae*. In: *Fenner's Veterinary Virology*, fifth edition, Ed. MacLachlan NJ & Dubovi EJ, Elsevier
18. 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> (bezocht: 4 november 2024)
19. Morizono K *et al.* (2001). Antibody-directed targeting of retroviral vectors via cell surface antigens. *J. Virol.* 75: 8016-8020
20. Bergman I *et al.* (2003). Vesicular stomatitis virus expressing a chimeric Sindbis glycoprotein containing an Fc antibody binding domain targets to Her2/neu overexpressing breast cancer cells. *Virol.* 316: 337-347
21. Guo M *et al.* (2020). Glypican-3: a new target for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *J. Cancer* 11: 2008
22. Shafizadeh N (2008). Utility and limitations of glypican-3 expression for the diagnosis of hepatocellular carcinoma at both ends of the differentiation spectrum. *Mod. Pathol.* 21: 1011-1018
23. Takahashi K & Yokobayashi Y (2019). Reversible gene regulation in mammalian cells using riboswitch-engineered vesicular stomatitis virus vector. *ACS Synth. Biol.* 8: 1976-1982
24. Ketzer P *et al.* (2014). Artificial riboswitches for gene expression and replication control of DNA and RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111: E554-E562
25. COGEM (2011). Classificatie van Vesicular stomatitis virus en inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde VSV deeltjes. COGEM advies CGM/110815-03

26. COGEM (2023). Actualisatie van de pathogeniciteitsclassificatielijsten met humaan- en dierpathogene DNA- en RNA-virussen (2023). COGEM advies CMG/230929-01
27. COGEM (2012). Inschaling van onderzoek naar Ebolavirus en Marburgvirus infecties met genetisch gemodificeerd VSIV. COGEM advies CGM/120417-02
28. COGEM (2016). Inschaling werkzaamheden met HIV-Env gepseudotypeerd gg-Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV). COGEM advies CGM/161221-01
29. COGEM (2017). Inschaling van werkzaamheden met gg-VSIV. COGEM advies CGM/170426-01
30. COGEM (2016). Omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg)-Vesicular stomatitis Indiana virus. COGEM advies CGM/160310-01
31. COGEM (2018). Inschaling van werkzaamheden met Vesicular stomatitis Indiana virus voorzien van het oppervlakte-eiwit van Lassa virus. COGEM advies CGM/181025-01
32. COGEM (2023). Inschaling van werkzaamheden met gg-VSIV gepseudotypeerd met het S-glycoproteïne van verschillende coronavirussen. COGEM advies CGM/230308-01
33. COGEM (2016). Omlaagschaling van werkzaamheden met gepseudotypeerd, 'single-round' genetisch gemodificeerd Vesicular stomatitis Indiana virus. COGEM advies CGM/160502-04
34. Garbutt M *et al.* (2004). Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. *J. Virol.* 78:5458-5465
35. Gao Y *et al.* (2009). Recombinant vesicular stomatitis virus targeted to Her2/neu combined with anti-CTLA4 antibody eliminates implanted mammary tumors. *Cancer Gene Ther.* 16: 44-52
36. Geisbert T W & Feldmann H (2011). Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and Marburg virus infections. *J. Infect. Dis.* 204: S1075-S1081
37. Geisbert TW *et al.* (2005). Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever. *PLoS Med.* 2: 537-545
38. Safronetz D *et al.* (2015). A recombinant Vesicular stomatitis virus-based Lassa fever vaccine protects guinea pigs and macaques against challenge with geographically and genetically distinct Lassa viruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* DOI:10.1371/journal.pntd.0003736
39. Monath *et al.* (2019). rVSVΔG-ZEBOV-GP (also designated V920) recombinant vesicular stomatitis virus pseudotyped with Ebola Zaire Glycoprotein: Standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. *Vaccine: X* 1:100009.
40. Hastie E *et al.* (2013). Understanding and altering cell tropism of vesicular stomatitis virus. *Virus Res.* 176: doi:10.1016/j.virusres.2013.06.003
41. Bergman I *et al.* (2004). Preferential targeting of vesicular stomatitis virus to breast cancer cells. *Virol.* 330: 24-33.
42. Gao Y *et al.* (2006). Rapid adaptation of a recombinant vesicular stomatitis virus to a targeted cell line. *J. Virol.* 80: 8603-8612
43. Van den Broek MF *et al.* Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev* 1995;148:5-18
44. Simon-Loriere E & Holmes EC (2011). Why do RNA viruses recombine? *Nat. Rev. Microbiol.* 9:617-626
45. Worobey M & Holmes CE (1999). Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology*, 80:2535-2543

46. Han GZ & Worobey M (2011). Homologous recombination in negative sense RNA viruses. *Viruses*, 3: 1358-1373