



Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 6 december 2012
KENMERK CGM/121206-01
ONDERWERP Advies productie van gg-*Measles virus* met heterologe oppervlakte-eiwitten

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijzigingsverzoek van vergunning IG 09-006 met de titel 'Genereren en produceren van vaccinvectoren gebaseerd op recombinant *Measles virus*' van Crucell Holland B.V., deelt de COGEM u het volgende mee:

Samenvatting

De COGEM is verzocht te adviseren over een wijzigingsverzoek voor de productie van vaccinvectoren gebaseerd op genetisch gemodificeerd (gg-) *Measles virus*. De COGEM merkt op dat zij niet om advies is gevraagd bij de eerdere vergunningverlening en dus niet eerder geadviseerd heeft over de inschaling van de werkzaamheden. De aanvrager wil gg-*Measles virus* produceren waarbij één of beide oppervlakte-eiwitten van het virus vervangen zijn door de oppervlakte-eiwitten van het *Human respiratory syncytial virus* of het *Mumps virus*. Deze oppervlakte-eiwitten (genaamd H en F) zijn verantwoordelijk voor binding aan de gastheercel en versmelting met het celmembraan.

De gg-virussen worden gemaakt op basis van de sterk verzwakte (geattenueerde) vaccinstam Edmonston-Zagreb (EZ). Deze vaccinstam kent een lange historie van veilig gebruik, zowel in gezonde individuen als in individuen met een verzwakte afweer.

De COGEM kan niet geheel uitsluiten dat het tropisme en/of de pathogeniteit van de verzwakte Edmonston-Zagreb vaccinstam, bij bepaalde modificaties zal veranderen. Hoewel het mechanisme van attenuatie van de EZ-stam niet geheel opgehelderd is, zijn er aanwijzingen dat de verzwakkende mutaties in de EZ-stam in bijna alle eiwitten aanwezig zijn. De COGEM acht het onwaarschijnlijk dat vervanging van de oppervlakte-eiwitten de (gehele) attenuatie van de EZ-stam teniet doet. In het theoretische geval dat dit wel gebeurt, zal het virus niet pathogener worden dan het wild-type *Measles virus*. Dit virus is geclassificeerd als een klasse 2 pathogeen waarmee op ML-II niveau gewerkt mag worden.

Op basis van deze gegevens is de COGEM van mening dat de productiewerkzaamheden op ML-II niveau en de vaccinatie-experimenten in muizen op DM-II niveau kunnen plaatsvinden. In beide gevallen onder navolging van enkele aanvullende werkvoorschriften.

Onder de hierboven genoemde inperkingsniveaus acht de COGEM de risico's bij handelingen met chimere Measles virussen voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

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

Hoogachtend,



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

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau GGO
Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

Productie van gg-*Measles virus* met heterologe oppervlakte-eiwitten

COGEM advies CGM/121206-01

Inleiding

De onderhavige aanvraag betreft een wijziging op een bestaande vergunning voor de productie van vaccinvectoren gebaseerd op recombinant *Measles virus*. Onder de bestaande vergunning wordt gg-*Measles virus* geproduceerd dat naast de eigen oppervlakte-eiwitten, heterologe oppervlakte-eiwitten van andere virussen, waaronder het *Varicella zoster virus*, *Human immunodeficiency virus*, *Human respiratory syncytial virus* (HRSV) en het *Mumps virus*, tot expressie brengt. De productie van deze gg-*Measles virus* is vergund op ML-II niveau. Daarnaast zijn vaccinatie-experimenten in muizen vergund op DM-II niveau.

De COGEM merkt op dat zij niet om advies is gevraagd bij de eerdere vergunningverlening en dus niet eerder geadviseerd heeft over de inschaling van de werkzaamheden. De COGEM wordt nu gevraagd om te adviseren over de productie van gg-*Measles virus* waarbij één of beide oppervlakte-eiwitten van het *Measles virus* volledig zijn vervangen door de oppervlakte-eiwitten van het HRSV of het *Mumps virus*. Deze recombinant chimere *Measles viruses* zullen geconstrueerd worden op basis van de levend-verzwakte Edmonston-Zagreb vaccinstam.

Measles virus

Het *Measles virus* is een zeer besmettelijk virus dat wordt verspreid via aerosolen. De klinische symptomen ontstaan ongeveer twee weken na infectie en bestaan uit koorts, hoesten, neusverkoudheid (coryza) en bindvliesontsteking van het oog (conjunctivitis) gevolgd door de karakteristieke uitslag. Mazelen wordt tevens geassocieerd met immuunsuppressie resulterend in toegenomen vatbaarheid voor opportunistische infecties.¹

Het *Measles virus* is, ondanks de beschikbaarheid van een veilig en kosteneffectief vaccin, jaarlijks verantwoordelijk voor grote sterfte. In 2010 waren er wereldwijd 139.300 sterfgevallen als gevolg van mazeleninfecties. Meer dan 95% van de sterfgevallen vindt plaats in lage-inkomenslanden met een slecht ontwikkelde gezondheidszorg.^{2,3}

Measles virus genoom

Het *Measles virus* behoort tot de familie *Paramyxoviridae*, genus *Morbillivirus*. Het virus wordt omgeven door een lipidemembraan en heeft een negatief enkelstrengs RNA genoom. Het genoom bevat zes genen die coderen voor 8 eiwitten. De structurele eiwitten 'nucleocapside' (N), 'phospho' (P), 'matrix' (M), 'fusion' (F), 'haemagglutinin' (H) en 'large' (L) en de niet-structurele eiwitten C en V.¹

Het nucleocapside eiwit vormt samen met het RNA genoom en het RNA-afhankelijke RNA polymerase, bestaande uit de P en L eiwitten, een zogenaamd ribonucleoproteïne complex. Het M-eiwit bekleedt het binnenoppervlak van het lipidemembraan en is betrokken bij het vrijkomen van het virus uit de cel en de regulatie van de transcriptie. De glycoproteïnes H en F bevinden zich in het lipidemembraan. Het H-eiwit is verantwoordelijk voor verankering aan de gastheer cel via

interactie met de receptoren CD46 en SLAM op de gastheercel. SLAM komt alleen tot expressie op een subset van afweercellen terwijl CD46 op tal van verschillende celtypen bij zoogdieren voorkomt.²² Neutraliserende antilichamen tegen het *Measles virus* zijn vooral tegen het H-eiwit gericht.⁴ Het F-eiwit zorgt voor fusie met het celmembraan van de gastheercel.

De expressie van het mazelengenoem volgt een zogenoemde transcriptiegradiënt waarbij de genen die dicht (proximaal) bij de promotor liggen sterker tot expressie komen dan de genen die verder (distaal) van de promotor af liggen.

Het *Measles virus* is als vertegenwoordiger van de *Paramyxoviridae* volgens de Nederlandse 'Lijst van pathogene micro-organismen en agentia' ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.⁵ Ook in Canada en Amerika wordt het *Measles virus* beschouwd als een klasse 2 pathogeen.^{6,7}

Levend-verzwakte mazelen vaccins

Het *Measles virus* werd in 1954 voor het eerst geïsoleerd uit een celcultuur. Uit deze zogenoemde Edmonston wild-type MV stam werd de levend-verzwakte Edmonston-B vaccinstam geproduceerd welke in 1963 op de markt kwam. Later werd deze stam opgevolgd door de meer verzwakte stammen Edmonston-Enders, Edmonston-Zagreb, Edmonston Moraten en Edmonston Schwarz.^{1,8,9} Deze vaccinstammen bleken veilig en effectief in de bestrijding van mazeleninfecties. De Edmonston-Zagreb stam is wereldwijd het meest gebruikte mazelenvaccin in het vaccinprogramma van de WHO.²²

Human respiratory syncytial virus

HRSV is een niet-gesegmenteerd negatief-strengig RNA virus dat behoort tot de familie *Paramyxoviridae*, genus *Pneumovirus*. Het virus wordt omgeven door een lipidemembraan met de drie oppervlakte-eiwitten 'attachment glycoprotein' (G), 'fusion' (F) en 'small hydrophobic protein' (SH). Het G-eiwit zorgt voor verankering van het virus aan de gastheercel en het F-eiwit zorgt voor fusie met het celmembraan.¹⁰ Het SH-eiwit vormt oligomeren die zich gedragen als ionkanalen. De biologische rol van deze ionkanalen is nog niet bekend.¹¹

Het virus komt wereldwijd voor en is de meest voorkomende oorzaak van longontsteking of bronchiolitis bij zuigelingen en jonge kinderen.^{12,13} Het virus verspreidt zich zeer snel en infecteert een groot deel van de bevolking in het eerste levensjaar.¹² Alleen al in de VS worden er jaarlijks meer dan 100.000 kinderen opgenomen als gevolg van een HRSV infectie.¹² In 2005 lag de mortaliteit van het virus tussen de 66.000 en 199.000 gevallen, waarvan 99% optrad in ontwikkelingslanden.¹³ Er bestaat nog geen vaccin tegen het virus.¹⁴ Het HRSV is door de COGEM ingeschaald als een klasse 2 pathogeen.¹⁵

Mumps virus

Het *Mumps virus* is een negatief-strengig RNA virus dat behoort tot de familie *Paramyxoviridae*, genus *Rubulavirus*. Het virale genoom codeert voor 8 eiwitten waaronder de oppervlakte-eiwitten 'hemagglutinin-neuraminidase' (HN) en 'fusion' (F). Het HN-eiwit is verantwoordelijk voor verankering aan de gastheercel via sialzuur dat aanwezig is op cellulaire lipiden en glycoproteïnen. Deze 'receptor' komt wijdverspreid tot expressie waardoor het virus veel

verschillende celtypen kan infecteren.¹⁶ Neutraliserende antistoffen zijn vooral tegen het HN-eiwit gericht.¹⁷

Het virus komt wereldwijd voor en veroorzaakt de bof wat gepaard gaat met koorts en zwellingen aan het hoofd. Het virus verspreidt zich efficiënt via hoesten of druppeltjes uit de neus- en keelholte.¹⁸ In 2007 waren er in de EU ruim 14.000 bevestigde gevallen van de bof.¹⁸ Over het algemeen daalt het aantal meldingen doordat steeds meer landen vaccinatie invoeren of de vaccinatiegraad onder kinderen verbetert.^{17,18}

Het *Mumps virus* is als vertegenwoordiger van de *Paramyxoviridae* volgens de eerder genoemde 'Lijst van pathogene micro-organismen en agentia' ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.⁵

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil gg-*Measles virus* produceren door één of beide oppervlakte-eiwitten (F en/of H) van het *Measles virus* volledig te vervangen door het F-eiwit van het HRSV of het HN-eiwit van het *Mumps virus*. In totaal heeft de aanvrager de volgende drie combinaties voor ogen;

1. een gg-*Measles virus* waarbij de coderende sequentie voor het H-eiwit is vervangen door de sequentie van het HN-eiwit van het *Mumps virus*,
2. een gg-*Measles virus* waarbij de sequenties van het F en H-eiwit zijn verwijderd en vervangen door de sequentie van het HRSV-F eiwit.
3. een gg-*Measles virus* waarbij alleen de sequentie van het F-eiwit van het *Measles virus* is vervangen door de sequentie van het HRSV-F eiwit.

Deze virussen zullen geconstrueerd worden op basis van de sterk verzwakte vaccinstam Edmonston-Zagreb (EZ). De gevormde gg-virussen worden vermeerderd door transductie in MRC-5, VERO en PER.C6 cellijnen. De aanvrager wil de productie van het gg-*Measles virus* uitvoeren op ML-II niveau en vaccinatie-experimenten in muizen uitvoeren op DM-II niveau.

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over de productie van chimeer *Measles virus* met heterologe oppervlakte-eiwitten. Wel heeft de COGEM in 2011 geadviseerd over een wijziging op een bestaande vergunning voor vaccinatiestudies met gg-*Measles virus* in makaken.¹⁹ Bij deze studies wordt gebruik gemaakt van levend-verzwakte gg-*Measles virus* gebaseerd op de Edmonston-Zagreb stam die het marker gen voor 'Enhanced Green Fluorescent Protein' (EGFP) tot expressie brengt. De aanvrager voerde de vaccinatiestudies op DM-III niveau uit. De COGEM werd gevraagd of de gevaccineerde apen 21 dagen na vaccinatie teruggeplaatst konden worden naar D-I inperkingsniveau. Er waren in de ogen van de COGEM geen redenen om aan te nemen dat de virulentie of pathogeniteit als gevolg van de verschillende modificaties toeneemt. De COGEM was van mening dat de risico's voor mens en milieu bij terugplaatsing van de makaken naar D-I niveau onder de door aanvrager genoemde voorwaarden verwaarloosbaar klein zijn.

Overweging

De aanvrager wil drie gg-virussen produceren waarvan één of beide oppervlakte-eiwitten vervangen is door het HRSV-F eiwit of het HN-eiwit van het *Mumps virus*. Deze virussen zullen geconstrueerd worden op basis van de sterk verzwakte vaccinstam Edmonston-Zagreb (EZ). Deze vaccinstam kent een lange historie van veilig gebruik, zowel in gezonde individuen als in individuen met een verzwakte afweer, bijvoorbeeld als gevolg van een HIV infectie.^{20,21} De mutaties die leiden tot verzwakking van het vaccinvirus zijn aanwezig over het gehele genoom waardoor er wijzigingen zijn in bijna alle acht eiwitten van het virus, met uitzondering van het F-eiwit.²²

De H en F-eiwitten zijn belangrijke determinanten van het tropisme van het *Measles virus*. Het H-eiwit is verantwoordelijk voor verankering aan de gastheercel en het F-eiwit voor fusie met het celmembraan. De aanvrager verwacht dat het tropisme van de chimere virussen door vervanging van de oppervlakte-eiwitten zal veranderen. Verder geeft de aanvrager aan dat veranderingen in de pathogeniteit van de recombinante virussen niet worden verwacht, maar ook niet geheel uit te sluiten zijn.

De eerste combinatie betreft een virus waarbij het H-eiwit is vervangen door de sequentie van het HN-eiwit van het *Mumps virus*. Deze wijziging heeft tot gevolg dat het tropisme zeer waarschijnlijk zal veranderen van binding aan CD46/SLAM receptoren naar binding aan sialzuur. Omdat CD46 en sialzuur wijdverspreid in het lichaam tot expressie komen, is het tropisme, ondanks de wijziging, nog steeds breed.

Hoewel het mechanisme van attenuatie van de EZ-stam niet geheel opgehelderd is, zijn er aanwijzingen dat de verzwakkende mutaties in de EZ-stam in bijna alle eiwitten aanwezig zijn, waaronder die betrokken bij aanhechting, replicatie en het onderdrukken van de afweer.²² Hiertoe behoren ook de P/V/C eiwitten die belangrijk zijn voor het onder controle houden van de niet-specifieke afweer. De COGEM acht het onwaarschijnlijk dat door vervanging van het H-eiwit de (gehele) attenuatie van de EZ-stam teniet wordt gedaan. In het theoretische geval dat dit wel gebeurt, zal het virus niet pathogener worden dan het wild-type *Measles virus*. Dit virus is als vertegenwoordiger van de *Paramyxoviridae* volgens de Nederlandse ‘Lijst van pathogene micro-organismen en agentia’ ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. Conform de Regeling ggo worden laboratoriumwerkzaamheden met klasse twee pathogenen ingeschaald op ML-II niveau.

Het tweede virus betreft een virus waarbij de sequenties van het F en H-eiwit zijn vervangen door de sequentie van het HRSV-F eiwit. Door het ontbreken van het H-eiwit wordt de primaire binding aan de gastheercel verstoord. Dit zal de infectie-efficiëntie hoogstwaarschijnlijk verminderen. Experimenten met recombinant HRSV in katoenratten tonen aan dat gg-HRSV zonder G-eiwitten, geattenuëerd is.¹⁴ Dit G-eiwit zorgt evenals het H-eiwit voor verankering aan de gastheercel. Op basis van deze gegevens is de COGEM is van mening dat het chimere *Measles virus* geattenuëerd blijft.

Het derde virus betreft een virus waarbij alleen de sequentie van het F-eiwit van het *Measles virus* is vervangen door de sequentie van het HRSV-F eiwit. Door aanwezigheid van het H-eiwit behoudt het virus zijn primaire bindingsmogelijkheid met de SLAM en CD46 receptoren. Het fusie-eiwit zal alleen betrokken zijn bij de snelheid van opname in de gastheer cel. Dit zal hooguit van invloed zijn op de infectie-efficiëntie. De COGEM is daarom van mening dat er bij dit chimere virus vermoedelijk geen tropisme verandering optreedt.

Alle mutaties die verantwoordelijk zijn voor attentuatie van het virus blijven behouden. Het F-eiwit is het enige eiwit in de EZ-stam dat geen mutaties bevat en derhalve niet betrokken is bij attentuatie.²² Vervanging van dit eiwit zal daarom naar de mening van de COGEM niet van invloed zijn op de attentuatie van het chimere *Measles virus*.

Advies

Op grond van bovenstaande gegevens kan de COGEM niet geheel uitsluiten dat vervanging van het H-eiwit met het HN-eiwit van het *Mumps virus* van invloed zal zijn op het tropisme en/of de pathogeniteit van de verzwakte EZ-vaccinstam. De COGEM verwacht echter niet dat de attentuatie (geheel) teniet wordt gedaan door deze modificatie. In het theoretische geval dat dit wel gebeurd zal het virus niet pathogener worden dan het wild-type *Measles virus* dat geclassificeerd is als een klasse 2 pathogeen.

Gezien de eigenschappen van de betrokken eiwitten is de COGEM van mening dat de chimere virussen uit de tweede en derde combinatie geattenuëerd blijven.

De COGEM adviseert daarom de productiewerkzaamheden op ML-II inperkingsniveau in te schalen en kan instemmen met de in de ontwerpbeschikking voorgestelde aanvullende voorschriften:

- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet van klasse-II uitgevoerd te worden;
- het dragen van handschoenen tot over de mouw van de werkkleding is verplicht.

Voorts is de COGEM van mening dat de vaccinatie-experimenten in muizen uitgevoerd kunnen worden op DM-II niveau. De COGEM kan instemmen met de in de ontwerpbeschikking voorgestelde aanvullende voorschriften:

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

Tevens wijst de COGEM erop dat de medewerkers conform de richtlijnen BMR-gevaccineerd moeten zijn.

Onder de hierboven genoemde inperkingsniveaus en aanvullende voorwaarden acht de COGEM de risico's bij handelingen met chimere *Measles virus* voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Griffin DE (2007). Measles virus. In: Fields virology, volume two, fourth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp1401-1441
2. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/ (27-11-12)
3. WHO (2009). Global reductions in measles mortality 2000-2008 and the risk of measles resurgence. Wkly Epidemiol Rec 84: 509-516
4. De Swart RL *et al.* (2005). Relative contributions of measles virus hemagglutinin- and fusion protein-specific serum antibodies to virus neutralization. J Virol. 79: 11547-11551
5. Bureau GGO, Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2010). Lijst van pathogene micro-organismen en agentia. November 2010
<http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten%20IG/Lijst%20van%20pathogene%20microorganismen%20en%20agentia%20BGGO%20niet%20cursief.pdf>
6. Public Health Agency of Canada. Measles virus - pathogen safety data sheet.
7. <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=VR-24&Template=animalVirology>
8. Ravanfar *et al.* (2009). Existing antiviral vaccines. Dermatol Ther. 22:110-28
9. De Vries *et al.* (2008). Measles vaccination: new strategies and formulations. Expert Rev Vaccines. 7:1215-23
10. Kumaria R *et al.* (2011). Whole genome characterization of non-tissue culture adapted HHRSV strains in severely infected children. Virol J. 8: 372
11. Gan SW *et al.* (2012). The small hydrophobic protein of the human Human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. J Biol Chem. 287: 24671-89
12. Public Health Agency of Canada. Respiratory syncytial virus - pathogen safety data sheet.
13. van Drunen Littel-van den Hurk S & Watkiss ER (2012). Pathogenesis of Human respiratory syncytial virus. Curr Opin Virol. 2: 300-305
14. Widjoatmodjo MN *et al.* (2010). A highly attenuated recombinant human respiratory syncytial virus lacking the G protein induces long-lasting protection in cotton rats. Virol J. 7:114
15. COGEM (2012). Classificaties van humane- en dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/120301-01
16. Carbone KM & Wolinsky JS (2007). Mumps virus. In: Fields virology, volume one, fourth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp1381-1400
17. MacDonald N, *et al.* (2011) Mumps is back: why is mumps eradication not working? Adv Exp Med Biol. 697: 197-220.
18. Nationaal Kompas volksgezondheid. Wat is bof en hoe vaak komt het voor? <http://bit.ly/zr8GQn> (27-11-12)
19. COGEM (2011). Verzoek tot wijziging vergunning vaccinatiestudie met gg-Measles virus in makaken. COGEM advies CGM/110509-01
20. Moss *et al.* (2003). Immunization of children at risk of infection with human immunodeficiency virus. Bul World Health Organ 81:61-70

21. WHO (2004) Measles vaccines. Wkly Epidemiol Rec 79: 130-142
22. Bankamp B *et al.* (2011). Genetic characterisation of measles vaccine strains. JID 1011:204