

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

DATUM 13 januari 2025
KENMERK CGM/250113-01
ONDERWERP Advies omlaagschaling werkzaamheden met replicons afgeleid van het Nodamura virus

Geachte heer Jansen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag (IG 24-133_2.8-000) getiteld 'Omlaagschaling van handelingen met replicons' ingediend door het Erasmus Medisch Centrum, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

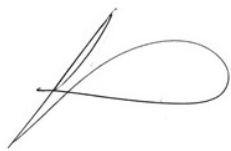
De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een replicon RNA-vaccin gebaseerd op het Nodamura virus (NoV). In het NoV RNA-vaccin is het gen dat codeert voor het NoV capside-eiwit, vervangen door het hemagglutinine (HA-)gen van het Influenza A virus of het Spike (S-)gen van het coronavirus SARS-CoV-2. De aanvrager verzoekt om infectiewerkzaamheden met proefdieren uit te mogen voeren op DM-I en handelingen met weefsels en cellen afkomstig van deze dieren op ML-I.

Het NoV-afgeleide vaccin dat bij de werkzaamheden zal worden gebruikt, is biologisch ingeperkt door het ontbreken van de sequentie van het capside-eiwit. Insertie van de HA- of S-genen van influenza A virus of SARS-CoV-2 kan deze biologische inperking niet opheffen. De COGEM adviseert als aanvullend voorschrift dat de proefdieren vrij moeten zijn van NoV en andere alphanodavirussen om complementatie en verdere verspreiding van het NoV vaccin uit te sluiten.

Het bovenstaande in overweging nemende stemt de COGEM in met de omlaagschaling van de infectiewerkzaamheden met proefdieren in combinatie met het replicon RNA-vaccin op DM-I en stemt zij in met het uitvoeren van handelingen met weefsels en cellen afkomstig van de proefdieren op ML-I. De COGEM adviseert het voorgestelde aanvullende voorschrift in acht te nemen dat de dieren vrij moeten zijn van NoV en verwante virussen. Bij het uitvoeren van de voorgenomen werkzaamheden op de geadviseerde inperkingsniveaus en onder navolging van het aanvullende voorschrift, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

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 dr. M. de Graaf niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Omlaagschaling werkzaamheden met een replicon RNA-vaccin gebaseerd op het Nodamura virus

COGEM advies CGM/250113-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren (IG 24-133) over de omlaagschaling van werkzaamheden met een replicon RNA-vaccin, gebaseerd op het Nodamura virus (NoV). In dit NoV RNA-vaccin is het gen dat codeert voor het capsid-eiwit verwijderd en vervangen door een codon-geoptimaliseerd hemagglutinine (HA-)gen van Influenza A virus (*Alphainfluenzavirus influenzae*) of het Spike (S-)gen van SARS-CoV-2 (*Betacoronavirus pandemicum*). De aanvrager, Erasmus MC, is voornemens om muizen, fretten en hamsters te infecteren met het repliconvaccin. Daarnaast is de aanvrager voornemens om werkzaamheden uit te voeren met cellen en weefsels afkomstig van deze dieren. De aanvrager verzoekt de dierproeven uit te mogen voeren op DM-I en handelingen met weefsels en cellen afkomstig van de dieren op ML-I. De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met het voorgestelde inperkingsniveau met inachtneming van een aanvullend voorschrift.

2. Achtergrondinformatie over het Nodamura virus

Het Nodamura virus (NoV, *Alphanodavirus nodamuraense*) behoort tot het genus *Alphanodavirus*, van de familie *Nodaviridae*.¹ In de familie *Nodaviridae* worden twee genera onderscheiden; het *Alphanodavirus* en *Betanodavirus*. Van nodavirussen is bekend dat zij kunnen repliceren in cellen van planten, insecten en zoogdieren.^{2,3} Alphanodavirussen zijn uit insecten geïsoleerd. Betanodavirussen staan bekend om het infecteren van vissen. Naast de alpha- en betanodavirussen is er ook een gerelateerde groep virussen die nematoden uit het genus *Caenorhabditis* kunnen infecteren, maar deze groep is nog niet door de ICTV geclassificeerd of als aparte familie toegekend.⁴

2.1 Het Nodamura virus

NoV is in 1956 voor het eerst geïsoleerd uit de muggensoort *Culex tritaeniorhynchus* in Nodamura, Japan.⁵ Er is geen epidemiologisch onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van NoV elders. In bepaalde insecten (honingbijen en wasmotten) en in zogende muizen en hamsters (1 tot 4 dagen oud) kan experimentele infectie met NoV leiden tot groeiachterstanden en verlammingen van het achterlijf met lethale afloop.^{6,7} De ziekteverschijnselen treden niet op bij experimentele infectie van muizen van 3-4 weken oud.^{8,9} Lacterende moedermuizen die een geïnfecteerd jong opeten, kunnen hun immunologische bescherming tegen NoV doorgeven aan de resterende jongen, vermoedelijk via de melk. De moederdieren vertonen hierbij geen ziekteverschijnselen.⁹

Muggen van de soort *Aedes aegypti* kunnen geïnfecteerd raken met NoV, wanneer zij zich voeden met bloed van geïnfecteerde muizen. Vervolgens kan NoV via *Ae. aegypti* worden overgedragen naar andere muizen.^{5,10} Daarnaast is RNA-replicatie aangetoond in verschillende zoogdier- en gistcellen en is aangetoond dat na infectie er virusdeeltjes gevormd kunnen worden in bepaalde zoogdiercellen.^{5,9,10,11,12} Serologisch onderzoek in Japan duidt op een mogelijke natuurlijke infectie van varkens, en mogelijk ook reigers.^{8,10} In hetzelfde onderzoek zijn geen antilichamen tegen NoV

gedetecteerd bij mensen die in contact stonden met mogelijk geïnfecteerde varkens.⁸ Het is niet bekend of NoV ziekte veroorzaakt in varkens. Tevens is niet bekend of de aanwezigheid van antilichamen een indicatie is van daadwerkelijke infectie, of veroorzaakt is door blootstelling aan het virus.

2.2 Genomische organisatie NoV

NoV is een virus met een enkelstrengs positief RNA-genoom dat bestaat uit twee segmenten.¹³ Dit bi-gesegmenteerde RNA-genoom is ingepakt in het capsid-eiwit. Het virusdeeltje bevat geen membraan en is ca 30 nm in diameter. Replicatie vindt plaats in het cytoplasma van geïnfecteerde cellen. NoV vormt hiervoor een replicatiecomplex dat zich in zoogdiercellen lokaliseert op het membraan van mitochondriën.¹⁴ Het grootste RNA segment, RNA1 (3,2 kb), kan autonoom repliceren in afwezigheid van het RNA2 en codeert onder andere voor het virale RNA-afhankelijke RNA-polymerase. Het RNA2 (1,4 kb), dat codeert voor het structurele capsid-eiwit, en is afhankelijk van aanwezigheid van het RNA1 voor replicatie.¹⁵ Zowel de aanwezigheid van RNA1 als RNA2 is vereist voor infectiviteit en de RNA's worden tezamen in het virusdeeltje ingepakt.^{3,16}

Na infectie wordt ook een subgenomisch RNA geproduceerd, het sgRNA3, dat niet in het uiteindelijke virusdeeltje terecht komt. Het sgRNA3 van NoV codeert voor twee varianten van het B2 eiwit die een verschillende N-terminale sequentie hebben. Het B2 eiwit fungeert in verschillende gastheren (insecten, planten en zoogdiercellen) als suppressor van RNA-interferentie (RNAi).^{10,17} Het sgRNA3 codeert ook voor een klein B1 eiwit, waarvan de functie nog onbekend is.

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens muizen, fretten en hamsters te vaccineren met replicon mRNA, gebaseerd op het Nodamura virus (NoV). Daarnaast is de aanvrager voornemens om werkzaamheden uit te voeren met cellen en weefsels afkomstig van deze dieren. In het repliconvaccin zal het RNA1 van het bi-gesegmenteerde NoV-genoom ongewijzigd blijven. In het RNA2 zal de genetische informatie voor het capsid-eiwit verwijderd worden, en vervangen worden door het transgen van interesse: een codon-geoptimaliseerd HA-gen van Influenza A virus-stammen of het S-gen van SARS-CoV-2-stammen. Het RNA-vaccin zal door *in vitro* transcriptie worden geproduceerd. De aanvrager stelt dat er geen productielijn of 'vector backbone' gebruikt wordt en enkel de geproduceerde virale RNA's aan de proefdieren zullen worden toegediend.

De aanvrager verzoekt de werkzaamheden op DM-I en ML-I uit te mogen voeren onder voorwaarde dat het gastheermateriaal vrij is van verwante Nodamuravirussen. Het Bureau GGO stelt voor de werkzaamheden uit te voeren op DM-I en ML-I met inbegrip van de aanvullende maatregel dat de dieren vrij zijn van Nodamura virus én andere verwante virussen. Na vaccinatie zullen 'challenge' experimenten uitgevoerd worden met wildtype influenza A virus en SARS-CoV-2, maar deze zullen onder respectievelijk DM-II en DM-III condities in onderdrukisolatoren plaatsvinden en vallen buiten deze adviesvraag.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft het Nodamura virus als strikt-dierpathogeen in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld.¹⁸ De COGEM heeft in dit advies tevens geadviseerd over infectiewerkzaamheden bij muizen met RNA-

vaccins afgeleid van NoV waarbij het gen dat codeert voor het NoV capside-eiwit, vervangen is door het hemagglutinine (HA-)gen van Influenza A virus stam California/07/09 of het Spike (S-)gen van SARS-CoV-2-Wuhan-Hu-1. De COGEM stemde in met de door de aanvrager voorgestelde inschaling om de werkzaamheden op DM-II niveau uit te voeren. Het RNA-vaccin in de huidige aanvraag betreft een RNA-vaccin die dezelfde varianten van HA- of het S-gen bevat (afkomstig van Influenza A virus stam California/07/09 en SARS-CoV-2-Wuhan-Hu-1) of varianten van andere Influenza A- en SARS-CoV-2-stammen.

5. Overweging

De aanvrager is voornemens proefdieren te vaccineren met gg-NoV repliconvaccins. Daarnaast is de aanvrager voornemens om werkzaamheden uit te voeren met cellen en weefsels afkomstig van de gevaccineerde dieren. De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met de omlaagschaling van deze werkzaamheden naar DM-I en ML-I met inachtneming van de door het Bureau GGO voorgestelde maatregel dat de proefdieren vrij zijn van NoV of verwante virussen.

5.1 Biologische inperking van het NoV repliconvaccin

Het NoV-afgeleide repliconvaccin, dat bij de voorgenomen dierexperimenten zal worden gebruikt, bestaat uit het RNA₁ en RNA₂, waarbij alleen het RNA₂ genetisch gemodificeerd is. Het RNA₂ codeert normaliter voor het capside-eiwit, dat het bi-gesegmenteerde RNA-genoom omsluit en het virusdeeltje vormt. In het NoV afgeleide repliconvaccin is het gen voor het capside-eiwit op het RNA₂ verwijderd en vervangen door het gen van interesse: het HA-gen van influenza A virus, of het S-gen van SARS-CoV-2. Door de afwezigheid van het NoV capside-eiwit kunnen geen virusdeeltjes gevormd worden. Expressie van de HA- of S-eiwitten in de geïnoculeerde gastheer kan niet leiden tot de productie van virusdeeltjes, omdat deze glycoproteïnen zich alleen in een virale envelop kunnen verankeren, dat niet aanwezig is bij Nodamuravirussen. Ook kunnen deze eiwitten de ontbrekende functie van het capside-eiwit niet complementeren. De COGEM is van oordeel dat het NoV repliconvaccin door de aangebrachte modificatie biologisch ingeperkt is en na één infectieronde niet verder zal verspreiden.

5.2 Complementatie en recombinitie bij co-infectie

De aanvrager merkt op dat in het theoretische geval er co-infectie optreedt met wildtype NoV in de gastheer, er geen risico bestaat dat een virusdeeltje zowel het aangepaste RNA₂, als wildtype RNA₂ (en RNA₁) zal bevatten, omdat de grootte en opnamecapaciteit van de virusdeeltjes de aanwezigheid van meer dan één kopie uitsluit. Voor de infectiviteit van wildtype NoV is zowel de aanwezigheid van RNA₁, dat verantwoordelijk is voor de genoomreplicatie, als RNA₂, dat betrokken is bij de verspreiding van het virusdeeltje, vereist.¹⁹

De COGEM is niet bekend met literatuur dat (experimenteel) uitsluit dat zowel een wildtype RNA₂ als het aangepaste RNA₂ gezamenlijk met RNA₁ in een virusdeeltje ingepakt kunnen worden. Echter, gezien de grootte van de virusdeeltjes is dit onwaarschijnlijk en is een dergelijk samengesteld nodamuravirusdeeltje mogelijk onstabiel, waardoor de kans op verdere verspreiding zeer onwaarschijnlijk is. Ook zou bij het ontstaan van een samengesteld nodamuravirusdeeltje geen

verandering in tropisme of verhoogde pathogeniteit optreden. Bij andere virussen leidt het inpakken van een extra RNA molecuul tot attenuatie.²⁰

Daarnaast zou er bij co-infectie met NoV, complementatie kunnen optreden waarbij zowel virusdeeltjes ontstaan die het wildtype RNA2 en RNA1 bevatten als virusdeeltjes met het wildtype RNA1 en het gg-RNA2. Ook in dit geval zijn er geen aanwijzingen dat dit zou leiden tot verandering in tropisme of pathogeniteit. Wel zou dit in theorie kunnen leiden tot verdere verspreiding van het gg-RNA2.

Indien er recombinatie bij een co-infectie met NoV zou optreden, leidt dit tot uitwisseling van het transgen in het gg-RNA2 met het capside-eiwitgen in het wildtype RNA2, waardoor er geen nieuwe combinaties van sequenties ontstaan.

In het geval van co-infectie met verwante nodavirussen kan vanwege het bi-gesegmenteerde RNA genoom 'reassortment' plaatsvinden, waarbij het RNA1 en RNA2 van verschillende nodavirussen ingepakt kunnen worden. Dit is beschreven voor enkele alphanodavirus-combinaties.²¹ Infectieuze reassortanten van NoV en Flock House virus konden echter niet verkregen worden: de RNA-polymerases van de afzonderlijke virussen lijken het RNA2 van het andere virus niet te herkennen als template.¹⁹ Voor 'reassortment' is het noodzakelijk dat co-infectie optreedt. Aangezien NoV een uitzondering vormt onder de alphanodavirussen met betrekking tot de mogelijkheid om zoogdieren te infecteren, is de COGEM van oordeel dat de kans op een reassortant met het gg-RNA2 afgeleid van NoV, verwaarloosbaar klein is. In het theoretische geval dat een dergelijke reassortant gevormd wordt (RNA1 van een ander nodavirus en het gg-RNA2), zal vanwege het ontbreken van het capside-eiwit geen virusdeeltje gevormd kunnen worden en is verdere verspreiding niet mogelijk.

Hoewel tot zover bekend alleen NoV in staat is om zoogdieren te infecteren, adviseert de COGEM uit voorzorg dat de proefdieren bij de voorgenenomen experimenten vrij moeten zijn van het Nodamura virus én andere alphanodavirussen om complementatie en verspreiding van het NoV repliconvaccin uit te sluiten.

6. Advies

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat het NoV repliconvaccin biologisch ingeperkt is en niet verder zal verspreiden. De COGEM stemt in met de door de aanvrager voorgestelde inschaling van infectiewerkzaamheden met muizen, fretten en hamsters in combinatie met het gg-NoV repliconvaccin op DM-I. Ook stemt zij in met het uitvoeren handelingen met cellen en weefsels afkomstig van deze dieren op ML-I. De COGEM adviseert als aanvullend voorschrift dat de dieren vrij moeten zijn van NoV én andere alphanodavirussen om complementatie en verdere verspreiding van het NoV repliconvaccin uit te sluiten. De COGEM is van oordeel dat bij het uitvoeren van de voorgenenomen werkzaamheden op deze inperkingsniveaus en onder navolging van het aanvullende voorschrift, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy: 2022 Release. <https://ictv.global/taxonomy> (bezocht: 18 december 2024)
2. Jiwaji M et al. (2019). Providence virus: An animal virus that replicates in plants or a plant virus that infects and replicates in animal cells? PLoS One. 14: e021749
3. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Family: *Nodaviridae*. <https://ictv.global/report/chapter/nodaviridae/nodaviridae> (bezocht: 18 december 2024)
4. Félix MA & Wang D (2019). Natural viruses of *Caenorhabditis Nematodes*. Annu. Rev. Genet. 53: 313-326
5. Scherer WF & Hurlbut HS (1967). *Nodamura virus* from Japan: a new and unusual arbovirus resistant to diethyl ether and chloroform. Am. J. Epidemiol. 86: 271-285
6. Bailey L & Scott HA (1973). The pathogenicity of *Nodamura virus* for insects. Nature 241: 545
7. Tesh RB (1980). Infectivity and pathogenicity of *Nodamura virus* for mosquitoes. J. Gen. Virol. 48: 177-182
8. Ball LA & Johnson KL (1998). *Nodaviruses* of Insects. In: The Insect Viruses 225-267. Ed. Miller LK & Ball LA. New York: Plenum
9. Ball LA et al. (1992). Replication of *Nodamura virus* after transfection of viral RNA into mammalian cells in culture. J. Virol. 66: 2326-2334
10. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Genus: *Alphanodavirus* <https://ictv.global/report/chapter/nodaviridae/nodaviridae/alphanodavirus> (bezocht: 18 december 2024)
11. Garzon S et al. (1990). Implication of mitochondria in the replication of *Nodamura virus* in larvae of the *Lepidoptera*, *Galleria mellonella* (L.) and in suckling mice. Arch. Virol. 113: 165-176
12. Price BD et al. (2005). *Nodamura virus* RNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*: heterologous gene expression allows replication-dependent colony formation. J. Virol. 79: 495-502
13. Friesen PD (2013). Insect viruses. *Nodaviridae*. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM et al., Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
14. Gant VU et al. (2014). Two membrane-associated regions within the *Nodamura virus* RNA-dependent RNA polymerase are critical for both mitochondrial localization and RNA replication. J. Virol. 88: 5912-5926
15. Lu R et al. (2005). Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. Nature 436: 1040-1043
16. Friesen PD (2013). Chapter 73: Insect viruses. *Nodaviridae*. In: Fields Virology, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
17. Schuster S et al. (2019). Antiviral RNAi in Insects and Mammals: Parallels and Differences. Viruses 11: 448
18. COGEM (2023). Pathogeniteitsclassificatie van het *Nodamura virus* (NoV) en inschaling van vaccinatieproeven met NoV-replicons in muizen. COGEM advies CMG/231121-01
19. Gopal R, Venter PA & Schneemann A (2014). Differential segregation of nodaviral coat protein and RNA into progeny virions during mixed infection with FHV and NoV. Virology 454-455: 280-290
20. Wichgers Schreur PJ et al. (2014). Creation of Rift Valley fever viruses with four-segmented genomes reveals flexibility in bunyavirus genome packaging. J. Virol. 88: 10883-10893.
21. Price BD et al. (2005). *Nodamura Virus* RNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*: heterologous gene expression allows replication-dependent colony formation. J. Virol. 79: 495-502