

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

DATUM 02 september 2025
KENMERK CGM/250902-02
ONDERWERP Advies Veterinaire studie met replicon-influenza vaccin in zwangere zeugen

Geachte heer Aartsen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 25-002_001 getiteld 'Field safety and efficacy evaluation of an RNA particle-based vaccine encoding hemagglutination proteins of multiple Influenza A virus strains in pregnant sows', afkomstig van Intervet International B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de milieurisico's van een veterinaire studie met zwangere varkens (zeugen) twee keer worden gevaccineerd met het vaccin IAV-S RP. Dit vaccin bevat twee typen genetisch gemodificeerde (gg-)replicondeeltjes (RP), afgeleid van een bekend en vaak gebruikt virus (Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) stam TC-83. Elk type gg-replicondeeltje codeert voor twee verschillende versies van een oppervlakte-eiwit (beiden hemagglutinine; HA) van Influenza A-virussen (IAV) die varkens ('swine'; IAV-S) infecteren.

Het doel van de studie is om te onderzoeken of het vaccin de zeugen en hun nakomelingen beschermt tegen infectie met IAV-S. Uit eerder onderzoek blijkt dat het vaccin 28 dagen na de laatste vaccinatie niet meer aanwezig is in de gevaccineerde zeugen. Nakomelingen (biggen) die 14 dagen na vaccinatie van de zeug worden geboren, worden verondersteld vrij te zijn van vaccindeeltjes. Zolang er zeugen aanwezig zijn die minder dan 28 geleden zijn gevaccineerd, worden tijdens de veterinaire studie de zeugen en alle contactdieren behandeld als dieren die mogelijk geassocieerd zijn met een ggo.

Het gebruikte vaccin IAV-S RP is niet ziekteverwekkend en wordt gemaakt met een veelgebruikt en veilig productiesysteem. De kans dat de replicondeeltjes genetisch combineren (recombineren) met verwante virussen die bij varkens voorkomen is verwaarloosbaar klein. Ook de kans op verspreiding van IAV-S RP wordt verwaarloosbaar geacht.

De COGEM concludeert dat het vaccin biologisch is ingeperkt en met de genomen maatregelen zich niet verder zal verspreiden. De milieurisico's van deze veterinaire studie zijn verwaarloosbaar klein. De COGEM stemt in met het uitvoeren van de veterinaire studie onder de in de aanvraag gestelde condities.

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. ir. G.P. Pijlman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Advies Veterinaire studie met replicon-influenza vaccin in zwangere zeugen

COGEM-advies CGM/250902-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vaccinatiestudie tegen influenza A bij varkens (IM-MV 25-002). Hiervoor zullen drachtige zeugen op verschillende varkensboerderijen gevaccineerd worden met een replicon-vaccin, IAV-S RP genaamd, dat gebaseerd is op de vaccinstam TC-83 van het Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV TC-83).¹ De twee soorten replicondeeltjes ('replicon particles'; RP's) in het vaccin bevat elk twee verschillende codongeoptimaliseerde sequenties die coderen voor hemagglutinine (HA) sequenties van Influenza A virus bij varkens (IAV-S). De aanvraag is afkomstig van Intervet International B.V. Het doel van deze veterinaire studie is om de veiligheid en werkzaamheid van het vaccin tegen Influenza A in varkens en hun nakomelingen te beoordelen.

2. Achtergrondinformatie over replicons gebaseerd op alfavirussen

Veel repliconproductiesystemen zijn gebaseerd op het Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV; tegenwoordig *Alphavirus venezuelan*, familie *Togaviridae*).^{1,2} VEEV wordt aangetroffen in (sub)tropische regio's van Zuid- en Centraal-Amerika.^{3,4} VEEV heeft een positief enkelstrengs RNA-genoom van ongeveer 11,5 kb, dat codeert voor vier niet-structurele eiwitten die betrokken zijn bij de virale RNA-replicatie, en voor de structurele eiwitten (C, E1, E2, E3, en 6K).^{2,5,6} Het virale RNA wordt omgeven door het capside-eiwit en tezamen vormen deze het nucleocapside. Om de eiwitmantel bevindt zich een lipidenmembraan met daarin de glycoproteïnen (envelopeiwitten E1 en E2) die betrokken zijn bij onder andere infectie van de gastheercel.⁷

VEEV veroorzaakt onder andere bij paardachtigen en mensen milde tot ernstige ziekte, variërend van koorts tot ernstige hersenontsteking (encefalitis). Bij volwassenen veroorzaakt infectie doorgaans milde klachten, terwijl infectie bij jonge kinderen kan leiden tot encefalitis,^{8,9} met soms blijvende neurologische problemen. De VEEV-stam waarop IAV-S RP is gebaseerd, VEEV TC-83, is een levend verzwakt VEEV-vaccin dat is verkregen is door attenuatie van de virulente VEEV-stam *Trinidad donkey*. Reversie naar wildtype VEEV is echter niet uitgesloten.¹⁰

Virale RNA-replicons, zoals gebruikt worden in het IAV-S RP vaccin, zijn zelf-replicerende RNA-constructen. De structurele genen van VEEV (TC-83) zijn verwijderd uit het RNA van de replicondeeltjes ('viral replicon particles', VRP's), en kunnen vervangen worden door een gewenst gen. Voor de productie van replicondeeltjes worden structurele genen *in trans* aangeboden via een co-infectie met één of meerdere helperconstructen (helper-RNA's) die deze genen bevatten. Er bestaan zowel 'single-helper'-systemen, waarbij alle structurele genen op één helper-RNA worden aangeboden, als 'split-helper'-systemen' waarbij het capside-gen en de genen coderend voor de twee envelopeiwitten over twee aparte helper-RNA's zijn verdeeld.¹¹

Na co-infectie in een productiecellijn worden de capside- en envelopgenen tot expressie gebracht. Deze eiwitten kapselen vervolgens het replicon-RNA in, waardoor replicondeeltjes ontstaan. Na zuivering kunnen de replicondeeltjes worden toegediend als vaccin. De gastheercellen worden getransduceerd met het replicon-RNA via de replicondeeltjes. Het RNA vermenigvuldigt zich in de cel,

waardoor er hoge hoeveelheden van het gewenste eiwit worden geproduceerd en een immuunrespons wordt opgewekt. Omdat de structurele genen ontbreken, kunnen geen nieuwe deeltjes gevormd worden en kan het replicon-RNA zich niet naar naastgelegen cellen verspreiden.

3. Achtergrondinformatie over Influenza A virussen bij varkens

Influenza A virus behoort tot het genus *Alphainfluenzavirus* (familie *Orthomyxoviridae*).¹ De oppervlakte-eiwitten hemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA) bepalen het subtype en spelen een belangrijke rol in de gastheerspecificiteit en immuunrespons.^{12,13,14,15} De subtypen H1N1, H1N2 en H3N2 van varkensinfluenzavirussen (IAV-S) circuleren onder varkens en zijn endemisch in West-Europese varkenspopulaties. Ze veroorzaken doorgaans milde ziekte met symptomen als koorts, lethargie, anorexie, gewichtsverlies, ademhalingsproblemen, hoesten en niezen.^{16,17,18} Varkensinfluenza staat niet op de lijst van de World Organisation for Animal Health (WOAH) van meldingsplichtige dierziekten en verloopt doorgaans mild. Humane infecties met varkensinfluenzavirussen zijn zeldzaam en meestal mild.^{18,19} Vaak betreft dit mensen die intensief contact hebben met varkens.

4. Opzet van veterinaire studie

In de veterinaire studie zullen maximaal 300 zwangere zeugen op 3 tot 6 varkensboerderijen gevaccineerd worden met het IAV-S RP vaccin, om de veiligheid en effectiviteit van het vaccin tegen Influenza A in varkens en hun nakomelingen te beoordelen. De varkensboerderijen waar dit mogelijk plaats zal vinden zijn gelegen in Gelderland, Limburg, Noord-Brabant, Overijssel en Utrecht. Het vaccin zal tweemaal intramusculair in de nek worden toegediend; eenmaal 8-6 weken en eenmaal 4-2 weken voor de verwachte werpdatum. Hierbij wordt beide keren een vaccindosis van 2 mL toegediend met een titer van maximaal $10^{9.3}$ IAV-S RP. Tijdens preparatie en toediening dragen medewerkers beschermende kleding. Naalden, spuiten en ander materiaal dat in contact komt met het vaccin wordt afgevoerd als medisch afval.

4.1 De replicondeeltjes in IAV-S RP

Het vaccin IAV-S RP bestaat uit twee soorten replicondeeltjes, die ieder coderen voor twee verschillende HA-eiwitten van varkensinfluenzastammen. Voor de productie van IAV-S RP – een proces wat niet onder deze vergunningaanvraag valt – wordt gebruik gemaakt van een split-helpersysteem. De twee codongeoptimaliseerde HA-sequenties, tezamen op een vector met de niet-structurele eiwitten van VEEV TC-83, worden gezamenlijk transfected met twee helper-RNA's. De helper-RNA's coderen respectievelijk voor de envelopeiwitten (E1-E3) en het capside-eiwit van VEEV TC-83. De HA-sequenties worden ieder tot expressie gebracht met behulp van een 26S-promoterelement. Deze promoterelementen zijn niet aanwezig in de helper-RNA's. Het capside-eiwit is aangepast waardoor de zelfklievende eigenschap – die voor het wildtype virus nodig is voor correcte translatie en transport van de structurele eiwitten – is verwijderd. De 5'- en 3'-UTRs, de ongetransleerde uiteinden van RNA-moleculen, zijn op alle vectoren gelijk en zijn aangepast zodat deze stopcodons bevatten.

4.2 Huisvesting van en omgang met gevaccineerde dieren en hun nakomelingen

Na vaccinatie worden de varkens gemonitord op eventuele reacties. Indien er tijdens de studie zeugen overlijden, worden deze voor sectie overgebracht naar de Gezondheidsdienst voor Dieren, of via de reguliere kanalen aangeboden voor verbranding. Mest, urine en placenta's die door de proefdieren worden geproduceerd, worden verzameld in de mestkelder van het bedrijf totdat deze vol is. Indien de

mestkelder binnen zeven dagen na een van de vaccinatiemomenten gelegeerd moet worden, wordt deze mest gebruikt om de landbouwgrond van de varkenshouder te bemesten. Indien de mestput later wordt gelegeerd, mag de mest aan derden worden aangeboden. Overig afval en biologisch materiaal wordt gezien als mogelijk gg-bevattend materiaal zolang het dier als ggo wordt aangemerkt.

Gevaccineerde varkens en hun nakomelingen worden 28 dagen na de laatste vaccinatie niet langer beschouwd als ggo-bevattende dieren; vanaf dat moment mogen de dieren op een reguliere manier worden gehuisvest en voor slacht worden afgevoerd. Zolang dieren die niet (langer) worden beschouwd als ggo-bevattend ('ggo-vrije' dieren) worden gehuisvest met dieren die mogelijk nog ggo's bevatten, worden ook de ggo-vrije dieren ook beschouwd als dieren die mogelijk geassocieerd zijn met ggo's.

5. Eerder COGEM-advies

De COGEM heeft VEEV ingeschaald in pathogeniteitsklasse 3. De VEEV vaccinstam TC-83 is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.^{20,21} De COGEM heeft niet eerder over klinische of veterinaire studies met replicons geadviseerd. Wel heeft de COGEM meermaals geadviseerd over werkzaamheden met replicons afgeleid van VEEV (TC-83) met verschillende donorsequenties,^{0.a. 22,23,24,25,26} waaronder replicons met HA-sequenties van IAV-S geproduceerd met hetzelfde repliconproductiesysteem als in de onderhavige studie.²⁷ Daarnaast is er tweemaal geadviseerd over de generiek omlaagschaling van werkzaamheden met virale replicons afgeleid van onder andere alfavirussen.^{28,29}

6. Overweging

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de veterinaire studie met IAV-S RP, dat replicondeeltjes bevat gebaseerd op VEEV TC-83. Mogelijke risico's bij deze studie zijn onder andere het eventuele ontstaan van infectieuze 'virus-like vesicles' (VLV's) en de effecten van mogelijke verspreiding van de gg-replicondeeltjes in het milieu.

6.1 Moleculaire karakterisering en aanwezigheid van replicatiecompetent virus in IAV-S RP

De COGEM heeft criteria opgesteld waaraan de moleculaire karakterisering van een ggo moet voldoen bij introductie in het milieu voor een klinische of veterinaire studie.³⁰ In deze criteria staat dat de genetische wijzigingen door middel van sequentiebepaling moeten zijn vastgesteld. De sequentieanalyse dient niet alleen de regio van de beoogde wijziging te omvatten, maar ook de flankerende sequenties van het genoom van het uitgangsgenoom. In de onderhavige aanvraag is de volledige sequentie van zowel de twee replicons met HA-sequenties als de twee helper-RNA's geverifieerd door middel van Sanger-sequencing.

In theorie zou tijdens het productieproces van de gg-replicondeeltjes replicatiecompetent virus (RCV) kunnen ontstaan. Hiervoor zouden de ontbrekende structurele genen op de juiste manier in het genoom van het replicon-RNA geïnsereerd worden. Met het split-helper systeem dat gebruikt is voor productie van IAV-S RP, is het ontstaan van RCV onwaarschijnlijk, omdat hiervoor meerdere recombinaties nodig zijn. Het vaccin IAV-S RP wordt alleen samengesteld wanneer er geen RCV aanwezig is in de gg-repliconbatch. Dit wordt getest met een zogenaamde in vitro cytopathic effect (CPE)-assay. De vaccinbatches die deze klinische studie zullen worden gebruikt vertonen geen CPE.

Op basis van bovenstaande punten is de COGEM van oordeel dat de moleculaire karakterisering van IAV-S RP voldoet aan de door haar gestelde eisen en dat er geen RCV aanwezig is in de te gebruiken vaccinbatches.

6.2 Pathogeniteit van het vaccin

De gg-replicondeeltjes in het vaccin IAV-S RP zijn gebaseerd op VEEV TC-83 en bevatten coderende sequenties voor verschillende HA-eiwitten van IAV-S. Op het oppervlak van de gg-replicondeeltjes zijn de envelopeiwitten van VEEV TC-83 aanwezig. De attenuatie van de vaccinstam VEEV TC-83 ten opzichte van wildtype VEEV wordt veroorzaakt door twee mutaties: één mutatie in de 5'-UTR en één mutatie in het structurele eiwit E2.³¹ De sequenties coderend voor de structurele eiwitten van VEEV TC-83 zijn niet aanwezig in de replicondeeltjes. Door de afwezigheid van de structurele genen kunnen na de initiële infectie geen nieuwe gg-replicondeeltjes in IAV-S RP gevormd worden.

Ter onderbouwing van de afwezigheid van ziekte na vaccinatie met IAV-S RP zijn enkele studies overlegd. Zo zijn onder andere muizen en varkens gevaccineerd met een vaccindosis die 200 keer hoger was dan de gebruikelijke dosis IAV-S RP. Uit de overlegde data blijkt dat deze dieren geen ziekteverschijnselen of vaccin-gerelateerde weefselpathologie vertoonden. Daarnaast zijn gegevens overlegd van een studie in paarden met gg-replicondeeltjes die zijn geproduceerd met hetzelfde productiesysteem als IAV-S RP, maar waarbij in plaats van HA-genen het gen voor een fluorescerend eiwit (GFP) is ingebracht. Ook hierbij werden geen ziekteverschijnselen waargenomen. Uit wetenschappelijke literatuur blijkt bovendien dat verschillende repliconvaccins op basis van VEEV, die onder andere het ebolavirus-glycoproteïne, het F-eiwit van het respiratoir syncytieel-virus (RSV) of een HA-eiwit van influenza-A virus tot expressie brengen, geen ziekteverschijnselen veroorzaken in proefdieren.^{32,33,34,35}

Op basis van bovenstaande punten is de COGEM van oordeel dat replicondeeltjes in IAV-S RP niet ziekteverwekkend zijn.

6.3 Recombinatie tussen replicons en wildtype-alfavirussen of varkensinfluenzavirussen

Recombinatie zou tijdens de voorgenomen veterinaire studie in theorie kunnen plaatsvinden wanneer er wild-type VEEV of een verwant influenzavirus aanwezig is in het gevaccineerde dier. Varkens zijn geen natuurlijke gastheer voor deze virussen. Recombinatie met VEEV en aan VEEV-verwante virussen kan daarnaast niet optreden omdat deze virussen niet voorkomen in Europa.^{3,4} Op basis van experimentele gegevens uit de wetenschappelijke literatuur wordt de kans op recombinitie, co-replicatie en recombinitie van gg-replicondeeltjes en verschillende soorten wildtype alfavirussen, als extreem laag ingeschat.^{36,37}

Er circuleren verschillende influenza A virussen (IAV) in Nederland in varkens en mensen. Co-infectie van dezelfde cel in varkens met IAV-S RP en een wildtype IAV is weliswaar zeer klein, maar niet volledig uit te sluiten. Het RNA dat codeert voor de HA-eiwitten is positiefstrengs, terwijl IAV een negatiefstrengs RNA-virus is. Replicatie van het IAV vindt daarnaast plaats in de celkern, terwijl amplificatie van het replicon-RNA plaatsvindt in het cytosol. De kans op recombinitie is hierdoor zeer klein.

De HA-sequenties in IAV-S RP bevatten geen UTR's of 'packaging'-signaal uit IAV. De HA-sequenties aanwezig in het replicongenoom zijn gecodonoptimaliseerd voor translatie in varkens,

waarbij de aminozuursequentie ongewijzigd is gebleven. In het zeer onwaarschijnlijke geval dat er door recombinatie een gg-virus zou ontstaan, is deze door gewijzigde sequenties naar verwachting verzwakt ten opzichte van wildtype influenzavirussen. Ditzelfde geldt voor door recombinatie ontstane gg-replicondeeltjes. Deze virussen en gg-replicondeeltjes zijn zeer verzwakt en zullen derhalve niet aanwezig blijven.

Dit wordt door de aanvrager onderbouwd met experimentele gegevens van een in vitro co-infectiestudie met een varkensinfluenzavirus en het IAV-S RP vaccin, uitgevoerd om potentiële recombinatie tussen IAV en de HA-sequenties uit de replicondeeltjes te onderzoeken. Na één passage kon er geen HA-eiwit afkomstig van de gg-replicondeeltjes meer worden gedetecteerd. Afhankelijk van het type HA-eiwit van de replicondeeltjes werd na twee tot zes passages geen RNA meer gedetecteerd dat codeerde voor HA-eiwitten in de replicondeeltjes, wat duidt op afwezigheid van recombinatie met IAV in deze studie.

Op basis van het bovenstaande is de COGEM van oordeel dat de kans op recombinatie van de gg-replicondeeltjes in IAV-S RP met wildtype-alfavirussen die voorkomen in varkens, verwaarloosbaar klein is. De kans op recombinatie met wildtype-influenzavirussen wordt als extreem klein beoordeeld. Verspreiding van deze verzwakte en minder pathogene virussen of gg-replicondeeltjes is eveneens zeer onwaarschijnlijk. Concluderend is de COGEM van oordeel dat de kans op het ontstaan en de verspreiding van gg-virussen of gg-replicondeeltjes die met wildtype IAV zijn gerecombineerd, verwaarloosbaar klein is.

6.4 Vorming van VLV's

De gg-replicondeeltjes in de onderhavige veterinaire studie bevatten geen structurele genen van VEEV. Zonder deze structurele genen is de vorming van nieuwe virale deeltjes niet mogelijk. In theorie kan de functie van de ontbrekende structurele genen worden hersteld wanneer de replicondeeltjes één of meerdere transgenen bevatten die coderen voor structurele eiwitten van andere virussen. Hierdoor zouden er mogelijk zogeheten infectieuze 'virus-like vesicles' (VLV's) kunnen ontstaan. Voor verschillende replicon-transgencombinaties is het ontstaan van VLV's experimenteel aangetoond.^{38,39,40,41,42,43,44,45,46,47}

Voor laboratoriumwerkzaamheden met alfavirusreplicons heeft de COGEM daarom werkzaamheden met replicons die genen bevatten voor bepaalde virale structurele eiwitten – zoals eiwitten met fusogene eigenschappen, die de fusie van celmembranen kunnen faciliteren – uitgesloten van de generieke omlaagschaling.^{28,29} Infectieuze VLV's die zo ontstaan zouden zich immers ongewenst verder kunnen verspreiden naar derden.

De aanvrager heeft onderzoek uitgevoerd naar de vorming van VLV's bij passage van de IAV-S RP replicons in celkweek. Hierbij is de aanwezigheid van VLV's niet aangetoond. De aanvrager stelt op basis hiervan dat het zeer onwaarschijnlijk zou zijn dat de IAV-S RP's VLV's vormen.

Voor de vorming van infectieuze deeltjes bij gebruik van een glycoproteïne (HA) van influenzavirussen wordt verondersteld dat co-expressie van het NA-eiwit noodzakelijk is.^{12,40} Hoewel aanhechting en membraanfusie bij influenzavirussen worden veroorzaakt door het HA-eiwit, is het NA-eiwit nodig om VLV's los te laten komen van het celoppervlak. De genen die coderen voor het NA-eiwit van

influenzavirussen zijn in de onderhavige aanvraag niet aanwezig in de gg-replicondeeltjes. In het theoretische geval dat VLV's gevormd worden in deze situatie, ontbreken hierin eiwitten die essentieel zijn voor verspreiding van de VLV's.

Het bovenstaande overwegende is de COGEM van oordeel dat de kans op het ontstaan van infectieuze VLV's bij expressie van de glycoproteïnen van IAV-S in alphavirus-repliconproductiesystemen verwaarloosbaar klein is.

6.5 Verspreiding van IAV-S RP naar het milieu en blootstelling van derden

6.5.1 Aanwezigheid en uitscheiding van IAV-S RP

Het repliconproductieplatform dat gebruikt is voor IAV-S RP wordt veelvuldig toegepast voor de productie van vergelijkbare gg-replicondeeltjes met andere transgenen. Het replicon kan zich wel vermenigvuldigen in een geïnfecteerde cel, maar door het ontbreken van genen voor structurele eiwitten kunnen er geen nieuwe virale deeltjes worden gevormd. Hierdoor zijn na de initiële infectie de gg-replicondeeltjes niet meer persistent aanwezig in het lichaam van het gevaccineerde dier, en kunnen zij zich dus ook niet verspreiden naar ongevaccineerde dieren die samen met gevaccineerde dieren worden gehuisvest. Dit wordt onderbouwd door een door de aanvrager uitgevoerde veiligheidsstudie, waarin Shetlandpony's werden gevaccineerd met een RP-GFP vaccin. Na vaccinatie werd geen replicondeeltje of RNA van RP-GFP gedetecteerd in serum, nasale of rectale monsters, noch bij ongevaccineerde paarden die samen met de gevaccineerde dieren werden gehuisvest.

Er zijn studies uitgevoerd om te achterhalen of het gebruik van HA-genen van IAV-S invloed heeft op de uitscheiding, verspreiding of het overdragen van de replicondeeltjes tussen dieren. Hiervoor is onderzoek gedaan naar muizen, varkens, en drachtige zeugen, waarbij gebruik werd gemaakt van hoge doses van het IAV-S RP vaccin of van gg-replicondeeltjes geproduceerd via hetzelfde productieplatform met andere HA-sequenties. Er is onderzocht of replicondeeltjes of RNA uit de vaccins kon worden gedetecteerd in bloed, lymfeklieren, orgaanweefsel, ontlasting, urine, neus en/of rectum.

Bij muizen en hun contactdieren zijn geen vaccin-RNA of infectieuze replicondeeltjes gedetecteerd, waaruit geconcludeerd kan worden dat in muizen geen shedding of verspreiding plaatsvindt. Bij het onderzoek in varkens met IAV-S RP, waar tot 14 dagen na vaccinatie monsters zijn afgenomen, werd geen vaccin-RNA aangetroffen in de neus of het rectum. Op de injectieplaats werd tot 14 dagen na vaccinatie replicon-RNA aangetroffen en 1 tot 3 dagen na vaccinatie niet-infectieuze replicondeeltjes. In andere monsters zijn geen replicondeeltjes aangetroffen. Wel werd bij een groot deel van de dieren, met name 1 tot 3 dagen na vaccinatie, replicon-RNA aangetroffen in o.a. urine, lymfeklieren, milt en serum. In één dier werd 1 dag na vaccinatie RNA van de gg-replicondeeltjes in de hersenen aangetroffen. Op basis van aanvullend onderzoek door de aanvrager naar virulentie van de aangetroffen deeltjes is de verwachting dat deze niet meer functioneel zijn.

Tot 14 dagen na vaccinatie is gekeken of RNA van de gg-replicondeeltjes waarneembaar was in de verschillende weefsels. Op dag 14 werd in een deel van de gevaccineerde varkens nog RNA van de gg-replicondeeltjes waargenomen, maar data over de aanwezigheid van genetisch materiaal na 14 dagen ontbreekt. De aanvrager stelt op basis van een regressieanalyse dat de dieren na 15-17 dagen volledig vrij zullen zijn van RNA van de gg-replicondeeltjes. De COGEM merkt op dat deze analyse niet is

overlegd, maar dat zij op basis van de gegevens 14 dagen na vaccinatie het aannemelijk acht dat de gg-replicondeeltjes afwezig zijn 28 dagen na vaccinatie.

Er is geen genetisch materiaal van het IAV-S RP vaccin of replicerende replicondeeltjes gevonden in de placenta, biest en het serum van drachtige zeugen die twee weken voor het werpen waren gevaccineerd, noch bij hun nakomelingen van een week oud. Dit duidt op erop dat er geen verticale transmissie plaatsvindt.

Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van oordeel dat het risico op verspreiding en overdacht van de gg-replicondeeltjes van de gevaccineerde dieren naar de omgeving, nakomelingen of dieren in dezelfde huisvesting verwaarloosbaar klein is.

6.5.2 Beschouwen van dieren, nakomelingen en afval als ggo

De zeugen worden 28 dagen na de laatste vaccinatie niet meer als geassocieerd met een ggo beschouwd. De nakomelingen worden 14 dagen na de laatste vaccinatie van de zeug niet langer beschouwd als ggo-bevattend dier. Echter, zolang 'ggo-vrije' dieren worden gehuisvest met dieren die minder dan 28 dagen geleden zijn gevaccineerd, worden deze 'ggo-vrije' dieren behandeld als ggo-geassocieerd. Het afval dat door de gevaccineerde varkens wordt geproduceerd (urine, feces, placenta) wordt verzameld in de mestput. Als de mestput binnen 1 week na vaccinatie (zowel de eerste als de tweede vaccinatie) wordt gelegeerd, zal het alleen op het eigen land uitgereden worden. Als de mestput later dan 1 week na vaccinatie gelegeerd wordt, kan de mest ook op het land van andere boerderijen (derden) uitgereden worden. Ander biologisch materiaal van de gevaccineerde dieren wordt – zolang het dier als ggo wordt beschouwd – behandeld als materiaal dat mogelijk ggo's bevat.

Het aantal dieren dat positief test op aanwezigheid van RNA van de gg-replicondeeltjes neemt na vaccinatie af. 14 dagen na de laatste vaccinatie met IAV-S RP is in een beperkt aantal dieren genetisch materiaal aangetroffen van IAV-S RP. Op basis van de niet-overlegde extrapolatie stelt de aanvrager dat de dieren 15-17 dagen na de laatste vaccinatie vrij zijn van (RNA van de) gg-replicondeeltjes.

Aan de hand van de aangeleverde data is in te schatten dat na 28 dagen de dieren vrij zullen zijn van (RNA van de) gg-replicondeeltjes. De COGEM merkt op dat de vergunningaanvrager de onderliggende data van een door hen uitgevoerde regressieanalyse niet heeft overlegd, waardoor de COGEM in haar oordeelsvorming zich heeft gebaseerd op eigen *expert judgement* en op wat volgens de aanvrager de uitkomst was van de regressieanalyse. Inzage in de data had de oordeelsvorming vereenvoudigd en nader onderbouwd.

De COGEM is van oordeel dat het niet langer als ggo-geassocieerd beschouwen van de gevaccineerde dieren 28 dagen na de laatste vaccinatie geen milieurisico voor mens of milieu oplevert. De COGEM is van oordeel dat er geen verspreiding en overdacht van de gg-replicondeeltjes zal plaatsvinden naar nakomelingen of contactdieren. Verder is de COGEM van oordeel dat de biggen vrij zijn van IAV-S RP. Vanuit milieurisico-overwegingen is de COGEM daarnaast van oordeel dat het niet noodzakelijk is om 'ggo-vrije' dieren die gehuisvest worden met gevaccineerde dieren te beschouwen als onderdeel van de ggo-proef. Echter, uit voorzorg voor eventuele verwisseling tussen gevaccineerde en niet-gevaccineerde dieren wordt de maatregel passend geacht.

De door de aanvrager aangeleverde gegevens tonen geen uitscheiding van de gg-replicondeeltjes aan in de mest van gevaccineerde dieren. Mocht er onverwacht wel nog gg-materiaal aanwezig zijn, dan zullen de hoeveelheden zeer laag zijn en in mest zeer snel worden afgebroken. De COGEM is derhalve

van oordeel dat er geen milieurisico's verbonden zijn aan het uitrijden van het afval van gevaccineerde dieren. Gevaccineerde dieren worden in de onderhavige aanvraag pas 28 dagen na de laatste vaccinatie als volledig vrij van ggo's beschouwd. De COGEM is daarom van oordeel dat het passend is om tot die tijd ook ander biologisch materiaal van deze dieren te beschouwen als materiaal dat mogelijk ggo's bevat, hoewel zij hier geen milieurisico in ziet.

7. Conclusie

Alles in ogenschouw nemende, is de COGEM van oordeel dat het IAV-S RP vaccin biologisch ingeperkt is en niet verder zal verspreiden. De COGEM is van oordeel dat milieurisico's verbonden aan deze veterinaire studie met het vaccin IAV-S RP verwaarloosbaar klein zijn en stemt zij in met het uitvoeren van de voorgenomen veterinaire studie onder de in de aanvraag gestelde condities.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy <https://ictv.global/taxonomy> (bezocht: 11 augustus 2025)
2. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: Fields Virology, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
3. Weaver SC et al. (2004). Venezuelan Equine Encephalitis. Annu. Rev. Entomol. 49: 141-174
4. Kumar B et al. (2018). Zoonotic viral Diseases of equines and their impact on human and animal health. Open Virol. J. 12: 80-98
5. Pietilä MK et al. (2017). Alphavirus polymerase and RNA replication. Virus Res. 234: 44-57
6. Rupp JC et al. (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. J. Gen. Virol. 96: 2483-2500
7. Jose J et al. (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. Future Microbiol. 4: 837-856
8. Griffin DE (2008). Togaviruses: Equine Encephalitic Viruses. In: Encyclopedia of Virology, third edition. Ed. Mahy BWJ & Van Regenmortel MHV, Elsevier Ltd.
9. Taylor KG & Paessler S (2013). Pathogenesis of Venezuelan equine encephalitis. Vet. Microbiol. 167: 145-150
10. Kenney JL et al. (2011). Stability of RNA virus attenuation approaches. Vaccine 29: 2230-2234
11. 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
12. Wright PF et al. (2013). Chapter 41: Orthomyxoviruses. In: Fields Virology, volume 1, sixth edition. Edited by Knipe DM et al. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia
13. McCauley JW et al. (2012). The Negative Sense Single Stranded RNA viruses. Family Orthomyxoviridae. In Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed. King AMQ et al., Elsevier Academic Press, Amsterdam
14. Shaw ML & Palese P (2013). Chapter 40 Orthomyxoviridae. In: Fields Virology, volume 1, sixth edition. Edited by Knipe DM et al. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia
15. Brown EG (2000). Influenza virus genetics. Biomed. Pharmacother. 54: 196-209
16. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Factsheet on swine influenza in pigs. <https://www.ecdc.europa.eu/en/swine-influenza/facts/swine-influenza-pigs> (bezocht: 11 augustus 2025)
17. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). Influenza van dierlijke oorsprong. <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/influenza-van-dierlijke-oorsprong> (bezocht: 11 augustus 2025)
18. World Organisation for Animal Health (WOAH) – Swine influenza. <https://www.woah.org/en/disease/swine-influenza/> (bezocht: 19 augustus 2025)
19. Centers for disease control and prevention (CDC). Key Facts about Human Infections with Variant Viruses <https://www.cdc.gov/flu/swineflu/keyfacts-variant.htm> (bezocht: 11 augustus 2025)
20. COGEM (2024). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificatielijsten met humaan- en dierpathogene DNA- en RNA-virussen (2024). COGEM-advies CMG/241210-02
21. COGEM (2017). Pathogeniteitsclassificatie van Venezuelan equine encephalitis virus vaccinstam TC-83. COGEM-advies CGM/170328-05
22. COGEM (2016). Inschaling van in vitro en in vivo werkzaamheden met replicons afgeleid van Venezuelan equine encephalitis virus. COGEM-advies CGM/160815-01

23. COGEM (2016). Onderbouwing van omlaagschaling van in vitro en in vivo werkzaamheden met gg-VEEV replicons. COGEM-advies CGM/160906-02
24. COGEM (2017). Werkzaamheden met gg-VEEV en gg-SPDV replicons met aquatische donorsequenties. COGEM-advies CGM/171030-03
25. COGEM (2017). Omlaagschaling van in vivo en in vitro werkzaamheden met Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) replicons. COGEM-advies CGM/170224-01 51
26. COGEM (2023). Inschaling van werkzaamheden met chimere Binjari en Palm Creek virussen (gg-BinJV en gg-PCV) en VEEV replicondeeltjes in muggen. COGEM-advies CGM/230828-01
27. COGEM (2017). Werkzaamheden met gg-alphavirus-replicons (SFV, SINV en VEEV) met donorsequenties van griepvirussen, Human respiratory syncytial virus, en Marburg- en Ebolavirussen. COGEM-advies CGM/171024-01
28. COGEM (2022). Generieke omlaagschaling van werkzaamheden met virale replicons afgeleid van alfavirussen en flavivirussen. COGEM-advies CGM/221223-01
29. COGEM (2025). Advies aanscherping voorwaarde m.b.t. inserts in alfavirus-replicons. COGEM-advies CGM/250430-01
30. COGEM (2013). Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing. COGEM-advies CGM/130227-05
31. Kinney RM et al. (1993). Attenuation of Venezuelan equine encephalitis virus strain TC-83 is encoded by the 5'-noncoding region and the E2 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 67: 1269-1277
32. Pushko P et al. (2000). Recombinant RNA replicons derived from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus protect guinea pigs and mice from Ebola hemorrhagic fever virus. *Vaccine* 19: 142-153
33. Hubby B et al. (2007). Development and preclinical evaluation of an alphavirus replicon vaccine for influenza. *Vaccine* 25: 8180-8189
34. Erdman MM et al. (2010). Alphavirus replicon particle vaccines developed for use in humans induce high levels of antibodies to influenza virus hemagglutinin in swine: Proof of concept. *Vaccine* 28: 594-596
35. Bates JT et al. (2016). Immunogenicity and efficacy of alphavirus-derived replicon vaccines for respiratory syncytial virus and human metapneumovirus in nonhuman primates. *Vaccine* 34: 950-956
36. Hick TAH (2023). Replicons ready to recombine? : assessing chimerization between self-amplifying mRNA vaccines and wild-type viruses [dissertatie]. Wageningen University. Chapter 3, RNA recombination between an alphavirusbased replicon vaccine and a wild-type alphavirus generates a chimeric alphavirus in vitro. 38-61
37. Hick TAH et al. (2024). Safety concern of recombination between self-amplifying mRNA vaccines and viruses is mitigated in vivo. *Mol. Ther.* 32: 2519-2534
38. Rose NF et al. (2014). In vitro evolution of high-titer, virus-like vesicles containing a single structural protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 111: 16866-16871
39. Rose NF et al. (2008). Hybrid alphavirus-rhabdovirus propagating replicon particles are versatile and potent vaccine vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 5839-5843
40. Rolls MM et al. (1994). Novel infectious particles generated by expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein from a self-replicating RNA. *Cell* 79: 497-506
41. Zhang C et al. (2021). Virus-like vesicles based on Semliki forest virus-containing rabies virus glycoprotein make a safe and efficacious rabies vaccine candidate in a mouse model. *J. Virol* 95: e0079021
42. Zhang YN et al. (2020). A novel rabies vaccine based on infectious propagating particles derived from hybrid VEEV-Rabies replicon. *EBioMedicine* 56: 102819
43. Chiale C et al. (2020). Modified Alphavirus-Vesiculovirus hybrid vaccine vectors for homologous prime-boost immunotherapy of chronic hepatitis B. *Vaccines* 8: 279
44. Lebedeva I et al. (1997). Infectious particles derived from Semliki Forest virus vectors encoding murine leukemia virus envelopes. *J. Virol.* 71: 7061-7067
45. COGEM (2023). Inschaling werkzaamheden met VEEV-replicondeeltjes met structurele genen van retrovirussen BLV en FeLV. COGEM-advies CGM/231019-01
46. Zhang HQ et al. (2024). Rational design of self-amplifying virus-like vesicles with Ebola virus glycoprotein as vaccines. *Mol. Ther.* 32: 3695-3711
47. Frolova EI et al. (2022). Acquisition of furin cleavage site and further SARS-CoV-2 evolution change the mechanisms of viral entry, infection spread, and cell signaling. *J. Virol.* 96: e00753