

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw S.A.M. Dijkma  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 12 juli 2017  
**KENMERK** CGM/170712-01  
**ONDERWERP** Advies inschaling werkzaamheden gg-*Influenza A virus*

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 17-094\_2.8-000 getiteld 'Het onder GMP produceren van vaccinmateriaal ten behoeve van een klinische trial', ingediend door HALIX, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde (gg-) *Influenza A virus* stam influenza A H3N2 delNS1. Deze stam bevat een deletie in het gen dat codeert voor het niet-structurele eiwit (NS1). De aanvrager wil in het kader van de vaccinproductie gg-virussen produceren met de oppervlakte-eiwitten van de A/Hong Kong/4801/2014 stam (H3N2).

De COGEM heeft eerder geadviseerd dat werkzaamheden met een gg-*Influenza A virus* op ML-II niveau ingeschaald kunnen worden, mits de uitgangsstam sterk verzwakt is.

De resultaten van vaccinatie- en dierstudies tonen aan dat door afwezigheid van NS1 in influenza A H3N2 het virus slechts in zeer beperkte mate kan vermenigvuldigen, omdat het de immunrespons niet meer kan remmen. Hierdoor vindt er vrijwel geen uitscheiding van het gg-virus plaats.

Op basis van de resultaten van verschillende vaccinatie- en dierstudies, acht de COGEM influenza A H3N2 delNS1 geattenuëerd ten opzichte van wildtype *Influenza A virus*. De COGEM acht een omlaagschaling van de voorgenomen werkzaamheden met deze influenzavirusstam van ML-III naar ML-II niveau gerechtvaardigd, met inachtneming van enkele aanvullende voorschriften.

Op bovengenoemd inperkingsniveau en onder navolging van de gestelde voorschriften acht de COGEM de risico's 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. ing. Sybe Schaap  
Voorzitter COGEM

c.c.           Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo  
                  Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

*Met het oog op eventuele belangverstrengelingen is het COGEM lid prof. dr. R.A.M. Fouchier niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Influenza A virus*

## COGEM advies CGM/170712-01

### 1. Inleiding

Naar aanleiding van vergunningaanvraag (IG 17-094) ingediend door HALIX, is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde (gg-) *Influenza A virus* stam, influenza A H3N2 delNS1. De aanvrager is voornemens vaccinmateriaal te produceren ten behoeve van een klinische studie.

### 2. *Influenza A virus*

#### 2.1 Ziektebeeld en overdracht

*Influenza A virus* kan mensen, vogels en zoogdieren infecteren. Humane influenza A virussen komen wereldwijd voor. Bij gezonde mensen kan een infectie zonder ziekteverschijnselen verlopen, maar meestal wordt infectie geassocieerd met milde tot matige symptomen, zoals koorts en koude rillingen, hoesten, spierpijn, hoofdpijn, en moeheid (griep). Deze klachten duren enkele dagen tot een week. Bij ouderen en mensen met een onderliggende ziekte, kan een infectie met *Influenza A virus* leiden tot ernstigere ziekteverschijnselen en tot een verhoogde kans op overlijden. Jaarlijkse griep epidemieën zijn verantwoordelijk voor 3 tot 5 miljoen ernstige ziektegevallen en 150.000 tot 500.000 doden wereldwijd.<sup>1</sup>

Het virus wordt door de lucht via aerosolen overgedragen, maar overdracht kan ook plaatsvinden via direct contact met besmette oppervlakten. Het virus infecteert luchtwegepitheelcellen en kan in deze cellen repliceren. Bij het vrijkomen van nieuwe virusdeeltjes sterven de besmette epitheelcellen af. Door deze beschadigingen aan het epitheel kunnen secundaire bacteriële infecties ontstaan, die een belangrijke oorzaak zijn van overlijden na infectie met het influenza virus.<sup>2</sup>

#### 2.2 Genomische organisatie *Influenza A virus*

*Influenza A virus* heeft een negatief enkelstrengs RNA genoom en behoort tot de familie *Orthomyxoviridae* en het genus *Influenzavirus A*.<sup>3</sup> Het RNA genoom van *Influenza A virus* bestaat uit acht unieke genoomsegmenten en codeert voor minstens 10 eiwitten, waaronder drie eiwitten die het RNA-polymerase vormen (PB1, PB2 en PA), het nucleoproteïne (NP), de matrixeiwitten M1 en M2 en de niet-structurele eiwitten NS1 en NS2, en haemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA).<sup>4,5</sup> Het HA eiwit is betrokken bij de aanhechting van het virus aan een gastheercel, terwijl het NA eiwit een rol speelt bij het vrijkomen van virusdeeltjes uit een geïnfecteerde cel. Beide eiwitten spelen een belangrijke rol bij de gastheerspecificiteit en de aanmaak van antistoffen tegen influenza A virussen.<sup>6,7</sup> Er bestaan 18 HA subtypes en 11 NA subtypes die geïsoleerd zijn uit vogels en vleermuizen, waarbij 198 (11x18) mogelijke combinaties kunnen ontstaan. Slechts drie combinaties (H1N1, H2N2 en H3N2) hebben dusver tot een pandemie geleid voor mensen.<sup>8</sup>

Wanneer een cel op hetzelfde moment door verschillende influenza A virussen wordt geïnfecteerd, kunnen genoomsegmenten of delen van genoomsegmenten tussen de virussen uitwisselen. Hierdoor kunnen virussen ontstaan die segmenten van meerdere virussen bevatten, zogenaamde 'reassortanten'. Dit proces wordt 'antigene shift' genoemd en kan ervoor zorgen dat er nieuwe virussen ontstaan die niet eerder bij mensen voorkwamen en waartegen de meeste mensen geen immuniteit hebben. 'Antigene drift' is een continu proces waarbij mutaties optreden in het virale RNA tijdens replicatie, waardoor het virus niet meer herkend wordt door de antistoffen van het afweersysteem. Hierdoor is het noodzakelijk dat het griepvaccin ieder jaar aangepast wordt aan de verwachte circulerende griepvirussen.

### **3. Gg-Influenza A virus stam influenza A H3N2 delNS1**

De aanvrager wil handelingen uitvoeren met de gg-Influenza A virus stam influenza A H3N2 delNS1. Dit gg-virus is gegenereerd door 'reverse genetics', waarbij in Vero-cellen co-transfectie plaatsvindt met 8 plasmiden die de sequenties van de verschillende virale segmenten bevatten (PA, PB1, PB2, NP, M, NS, HA en NA). Hiervoor wordt gebruik gemaakt van de vector pHW2000.<sup>9</sup> Om influenza A H3N2 delNS1 te produceren wordt gebruik gemaakt van 5 gensegmenten (PA, PB2, NP, M en 'truncated' NS) afkomstig van de geattenueerde stam influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), waarvan het NS1 gen gedeleteerd is. Eén gensegment (PB1) is afkomstig van de stam influenza A/Texas/1/77 (H3N2), en de NA en HA gensegmenten zijn afkomstig van influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2). Deze specifieke Hong Kong stam is door de WHO aanbevolen als seizoensgebonden vaccinstam voor 2017-2018.<sup>10</sup>

De aanvrager stelt dat influenza A delNS1 een geattenueerd gg-Influenza A virus is, vanwege de deletie in het NS gensegment. De deletie in het NS gen betreft het ORF van NS1, met uitzondering van de basen die coderen voor de eerste 10 aminozuren die gedeeld worden met het NS2 eiwit (ook wel 'nuclear export protein' (NEP) genoemd).<sup>11</sup> Volgens de aanvrager kan deze deletiemutant in de gastheer luchtwegepitheelcellen infecteren, maar is replicatie niet mogelijk.

### **4. Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft in 2004 alle influenza A virussen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.<sup>12</sup> De geattenueerde influenzastammen A/WSN/33, Puerto Rico/8/34 en Port Chalmers/1/73 zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.<sup>13,14,15</sup>

In een advies uit 2005 waarin de COGEM influenzastam A/Puerto Rico/8/34 als avirulent en sterk geattenueerd voor mensen heeft bestempeld, stelde de COGEM dat eerdere experimenten hebben aangetoond dat recombinante virussen, bestaande uit 6 gensegmenten van A/Puerto Rico /8/34 en 2 gensegmenten (HA en NA) van een wild-type humaan influenza virus, niet virulent zijn voor mensen.<sup>16,17</sup> Ook blijkt de mate van attenuatie verder toe te nemen wanneer de recombinante virussen meer A/Puerto Rico/8/34 gensegmenten bevatten.<sup>16</sup>

In 2006 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met gg-influenza A virussen.<sup>18</sup> Zij stelde dat laboratoriumwerkzaamheden met gg-influenza A virussen minimaal plaats moet vinden onder ML-III inperkingsniveau. De COGEM heeft

hieraan toegevoegd dat specifieke activiteiten, zoals werkzaamheden met sterk verzwakte virusstammen, mogelijk op een lager niveau (ML-II) uitgevoerd kunnen worden. Ook stelde de COGEM dat verspreiding dient te worden tegen gegaan en contact met deze virussen geminimaliseerd dient te worden. Om de risico's tijdens werkzaamheden op ML-III en ML-II niveau verder te beperken, heeft de COGEM de volgende aanvullende voorschriften geadviseerd:

- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse II;
- Medewerkers dienen gevaccineerd te zijn;
- Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden;
- Het dragen van handschoenen is verplicht;
- Bij werkzaamheden met H7 gg-influenzavirussen is een beschermende bril verplicht;
- Het dragen van een mond- en neuskapje (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2) is verplicht.

Verder heeft de COGEM meerdere keren geadviseerd over de omlaagschaling van laboratoriumwerkzaamheden met recombinante influenza A virussen.<sup>13,19,20,21,22</sup> Als voorwaarden zijn destijds genoemd:

- De recombinante virussen moeten bestaan uit minimaal zes genoomsegmenten afkomstig van een niet-virulente, verzwakte laboratoriumstam in combinatie met één of twee genoomsegmenten van andere influenzavirussen;
- Voor heterologe HA-coderende gensegmenten moet een polybasische klievingsplaats uitgesloten zijn;
- De heterologe genoomsegmenten zijn volledig gekarakteriseerd en er mogen geen ongedefinieerde mutaties aangebracht zijn.

## 5. Overweging en Advies

Laboratoriumhandelingen met gg-influenza A virussen worden in beginsel op grond van de classificatie van het *Influenza A virus* (pathogeniteitsklasse 3) op ML-III inperkingsniveau ingeschaald. Echter, voor laagpathogene influenza A virussen, of voor geattenueerde virussen, kan een lagere inperking worden gehanteerd.

De aanvrager wil werkzaamheden verrichten met influenza A H3N2 delNS1. Dit gg-virus bestaat uit vijf gensegmenten van de geattenueerde *Influenza A virus* stam influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), één gensegment van influenza A/Texas/1/77 (H3N2), en de NA en HA gensegmenten van A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2). Het influenza A/Texas/77 PB1 gensegment is afkomstig van de zogenaamde 'high growth reassortant' IVR-116. IVR-116 is een 5:2:1 reassortant, waarbij vijf gensegmenten afkomstig zijn van A/Puerto Rico/8/34, twee gensegmenten (NA en HA) van A/New Caledonia/20/99 en één gensegment (PB1) van A/Texas/77.<sup>23,24</sup> IVR-116 is eerder gebruikt voor de productie van influenza A virusvaccins met andere heterologe HA en NA moleculen dan in de onderhavige aanvraag.<sup>24,25</sup>

Het NS1 gensegment afkomstig van influenza A/Puerto Rico/8/34 bevat een deletie, waardoor influenza A H3N2 delNS1 volgens de aanvrager beschouwd kan worden als een geattenuëerd virus. De aanvrager baseert zich hiervoor op verscheidene (klinische) studies en de wetenschappelijke literatuur over delNS1 influenza A virussen.<sup>11, 25,26,27</sup> Het NS1 eiwit is onder andere betrokken bij het onderdrukken van de interferon (IFN)-gemedieerde antivirale respons van de gastheer.<sup>11,26</sup> Influenza A delNS1 stammen kunnen hierdoor niet of nauwelijks repliceren in interferon-competente cellen.<sup>11,26</sup> De immunogeniciteit en veiligheid van intranasale delNS1 vaccins is al in enkele studies gedemonstreerd, en ook vond er geen uitscheiding plaats van het virus in een klinische studie<sup>27</sup> en een studie bij fretten, muizen en apen.<sup>24</sup> In een andere klinische studie werd het vaccinvirus alleen uitgescheiden bij twee van de 36 deelnemers, in een neusuitstrijk 12 uur na intranasale toediening van de hoogste dosering (7,7 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>, 'median tissue culture infective dose').<sup>25</sup> Het is echter onduidelijk of het uitgescheiden virus een restant was van de toediening, of een product van (beperkte) virusrePLICatie.

De COGEM heeft in het verleden voor diverse recombinante virussen met minstens zes gensegmenten van een geattenuëerde influenza A virus stam en met één of twee gensegmenten van een wildtype influenza virus, omlaagschaling mogelijk geacht.<sup>13,19,20,21,22</sup> In de onderhavige aanvraag heeft de aanvrager gensegmenten van 3 verschillende influenzavirussen gebruikt, waarbij vijf gensegmenten afkomstig zijn van de geattenuëerde stam A/Puerto Rico/8/34, en waarin aanvullend een deletie is aangebracht in het NS1 gensegment. De COGEM is van oordeel dat door deletie van het NS1 gen, influenza A H3N2 delNS1 als geattenuëerd virus kan worden beschouwd, gebaseerd op de afwezigheid van een polybasische klievingsplaats in het HA-coderende segment<sup>28</sup>, de verminderde capaciteit om de IFN-gemedieerde antivirale respons te onderdrukken, en het bewezen veilige gebruik van delNS1 stammen in (klinische) studies.<sup>11,26,27,24</sup> In theorie zou de antivirale respons onderdrukt kunnen worden door de aanwezigheid van een ander virus, waardoor influenza A H3N2 delNS1 in beperkte mate zou kunnen repliceren en uitscheiding mogelijk zou zijn. Hier is echter nooit melding van gemaakt in vaccinstudies en dierproeven met delNS1 virussen. Bovendien zal de antivirale respons in immuuncompetente personen de virusrePLICatie tegengaan, en zal er geen verspreiding van het gg-virus plaatsvinden. Derhalve acht de COGEM de kans op rePLICatie door onderdrukking van de antivirale respons verwaarloosbaar klein. Dit alles in overweging nemende, adviseert de COGEM om werkzaamheden met influenza A H3N2 delNS1 op ML-II inperkingsniveau in te schalen.

De COGEM wijst erop dat de kans op het ontstaan van reassortanten door blootstelling aan een delNS1 virus in personen die een wildtype influenza A virusinfectie doormaken, niet geheel uitgesloten is. In deze situatie zou deletie van het NS1 gen gecompenseerd kunnen worden in cellen die geïnfecteerd zijn door zowel wildtype als *gg-Influenza A virus*.

Om eventuele risico's te beperken adviseert de COGEM bij werkzaamheden met influenza A H3N2 delNS1 de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Open handelingen dienen in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd te worden;

- Medewerkers dienen gevaccineerd te zijn tegen de actueel circulerende humaan *Influenza A virus* stammen;
- Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden;
- Het dragen van handschoenen is verplicht;

Onder bovengenoemd inperkingsniveau en onder navolging van de genoemde aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

## Referenties

1. World Health Organisation. Influenza (seasonal) fact sheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/> (bezoekt: 03-07-2017)
2. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). LCI-richtlijn Influenza. [www.rivm.nl/Documenten\\_en\\_publicaties/Professioneel\\_Praktisch/Richtlijnen/Infectieziekten/LCI\\_richtlijnen/LCI\\_richtlijn\\_Influenza](http://www.rivm.nl/Documenten_en_publicaties/Professioneel_Praktisch/Richtlijnen/Infectieziekten/LCI_richtlijnen/LCI_richtlijn_Influenza) (bezoekt: 03-07-2017)
3. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy: 2016 Release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 03-07-2017)
4. 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
5. Wright PF *et al.* (2013). *Orthomyxoviruses*. In: Fields Virology, volume 1, sixth edition. Edited by Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia
6. Brown EG (2000). Influenza virus genetics. Biomed. Pharmacother. 54: 196-209
7. Zambon MC (2001). The pathogenesis of influenza in humans. Rev. Med. Virol. 11: 227-241
8. Wu NC & Wilson IA (2017). A perspective on the structural and functional constraints for immune evasion: Insights from the influenza virus. J. Mol. Biol. pii: S0022-2836(17)30316-9
9. Hoffmann E *et al.* (2000). A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97: 6108-6113
10. World Health Organization (WHO). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2017-2018 northern hemisphere influenza season. [http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2017\\_18\\_north/en/](http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2017_18_north/en/) (bezoekt: 03-07-2017)
11. García-Sastre A *et al.* (1998). *Influenza A virus* lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. Virology 252: 324-330
12. COGEM (2004). Inschaling van Influenza A virusstammen. COGEM advies CGM/040326-03
13. COGEM (2005). Pathogeniteitstudies met recombinante Influenza A virussen. COGEM advies CGM/050201-01
14. COGEM (2006). Ontwikkeling van recombinante influenza virussen met behulp van een 'reverse genetics' systeem. COGEM advies CGM/060724-03

15. COGEM (2017). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen (2017). COGEM advies CGM/170522-03
16. World Health Organization (WHO), Production of pilot lots of inactivated influenza vaccines from reassortants derived from avian influenza viruses. Interim biosafety risk assessment. (2003), no. WHO/CDS/CSR/RMD/2003.5
17. Wood JM &Robertson JS (2004). From lethal virus to life-saving vaccine: developing inactivated vaccines for pandemic influenza. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 842-847
18. COGEM (2006). Aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde influenza A virussen. COGEM advies CGM/061214-01
19. COGEM (2007). Inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd influenzavirus. COGEM advies CGM/070510-02
20. COGEM (2010). Inschaling van werkzaamheden met gg-influenza A/Udorn/307/72. COGEM advise CGM/100830-02
21. COGEM (2006). Handelingen met recombinant H7N7 in serologisch onderzoek (IG 06-052/01). COGEM advies CGM/061218-01.
22. COGEM (2006). Handelingen met laag pathogene H5N1 in serologisch onderzoek (IG 06-052). COGEM advies CGM/060724-04.
23. Nicolson C *et al.* (2005). Generation of influenza vaccine viruses on Vero cells by reverse genetics: an H5N1 candidate vaccine strain produced under a quality system. *Vaccine* 23: 2943-2952
24. Romanova J *et al.* (2009). Preclinical evaluation of a replication-deficient intranasal  $\Delta$ NS1 H5N1 influenza vaccine. *PLoS One* 4:e5984 1-12
25. Wacheck V *et al.* (2010). A novel type of influenza vaccine: Safety and immunogenicity of replication-deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1. *J. Infect. Dis.* 201:354-362
26. Egorov A *et al.* (1998). Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J. Virol.* 72: 6437-6441
27. Mössler C *et al.* (2013). Phase I/II trial of a replication-deficient trivalent influenza virus vaccine lacking NS1. *Vaccine* 31: 6194-6200
28. Schrauwen EJ *et al.* (2011). Insertion of a multibasic cleavage site in the haemagglutinin of human influenza H3N2 virus does not increase pathogenicity in ferrets. *J. Gen. Virol.* 92: 1410-1415