

Aan de minister van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke  
Ordening en Milieubeheer  
Mevrouw dr. J.M. Cramer  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

24 juli 2007  
CGM/070724-01  
Advies recombinant *Yellow Fever virus* vaccin met *West Nile virus* insert

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een verzoek tot wijziging in de vergunning IG-03-089/03 met de titel "Evaluatie van een *Yellow Fever virus* (YFV) recombinant met M/E-geninsertie van het *West Nile virus* (WNV) in proefdieren" van Intervet International B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een verzoek tot omlaagschaling van experimenten met een recombinant *Yellow Fever virus* (YFV) vaccin. Het doel van de studie is de ontwikkeling van een vaccin voor paarden tegen het *West Nile virus* (WNV). In dit onderzoek wordt een recombinant *Yellow Fever virus* vaccin (YFV) met oppervlakte eiwitten van het WNV getest in proefdieren.

In 2003 adviseerde de COGEM het chimere virus YF-WNV te beschouwen als een volvirulent virus van pathogeniteitsklasse 3 omdat er destijds onvoldoende gegevens waren over mogelijke veranderingen in tropisme, replicatie en de genetische stabiliteit van het YF-WNV. Op basis van nieuwe gegevens dient de aanvrager een verzoek in tot verlaging van het inperkingsniveau van de experimenten van ML-III naar ML-II niveau.

De COGEM is van mening dat de aanvullende gegevens voldoende aantonen dat het recombinante YF-WNV virus tenminste net zo geattenuëerd is als de YF-17D ouderstam die al geruime tijd als vaccin wordt toegepast en is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. De aanvullende gegevens hebben ook aangetoond dat er geen veranderingen optreden in weefsel tropisme of replicatiekinetiek van het YF-WNV. Bovendien acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat het virus zich kan verspreiden via muggen.

De laboratoriumwerkzaamheden kunnen naar het inzicht van de COGEM veilig worden uitgevoerd op ML-II niveau met inachtneming van de voorgestelde aanvullende voorschriften. De COGEM is van mening dat de veiligheid voor mens en milieu middels deze indeling voldoende gewaarborgd blijft.

Dit advies bevat vertrouwelijke informatie en zal derhalve niet gepubliceerd of op een andere wijze openbaar gemaakt worden. De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized loop followed by a horizontal line that ends in a small hook.

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

c.c. Dr. ir. B.P. Loos  
Dr. I. van der Leij

## Evaluatie van een recombinant *Yellow Fever virus* vaccin

### COGEM advies CGM/070724-01

#### Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een wijziging in de vergunning voor werkzaamheden met het *Yellow Fever virus* (YFV) en het *West Nile virus* (WNV) van Intervet International B.V. (IG-03-089/03). Het doel van deze studie is de ontwikkeling van een vaccin voor paarden tegen het WNV. Hiertoe wordt een recombinant YFV met oppervlakte eiwitten (*M/E*-geninsertie) van het WNV getest in proefdieren.

In 2003 adviseerde de COGEM het recombinante YF-WNV vaccin te beschouwen als een volvirulent virus van pathogeniteitsklasse 3 omdat er destijds onvoldoende gegevens waren over mogelijke veranderingen in tropisme en replicatiekinetiek. Daarnaast ontbraken gegevens over de genetische stabiliteit van het recombinante YF-WNV. Op basis van nieuwe gegevens dient de aanvrager een verzoek in tot omlaagschaling van het inperkingsniveau van de laboratoriumhandelingen met een recombinant YF-WNV vaccin van ML-III naar ML-II niveau.

#### *Vertrouwelijkheid*

De aanvullende gegevens betreffen onder andere een aantal studies van Intervet B.V. die vertrouwelijke gegevens bevatten. Het YF-WNV vaccin is op basis van deze vertrouwelijke data geregistreerd bij de APHIS/USDA en toegelaten als levend vaccin in de Verenigde Staten. De COGEM acht deze vertrouwelijke gegevens van belang om haar advies te onderbouwen. Daarom zal dit advies niet gepubliceerd of op andere wijze openbaar gemaakt worden.

#### *Yellow Fever virus (YFV)*

Het *Yellow Fever virus* (YFV) is een positief strengs RNA virus dat behoort tot de familie van *Flaviridae*, genus *Flavivirus* (1). Het virus wordt verspreid via muggen en veroorzaakt gele koorts, een tropische infectieziekte die voorkomt onder apen in Afrika ten zuiden van de Sahara en in Zuid-Amerika. YFV kan ook worden overgebracht op mensen door de mug *Aedes aegyptii*. Symptomen van gele koorts bij de mens zijn koorts, hoofdpijn, rugpijn, misselijkheid, geelzucht en stoornissen in de nierfunctie. Daarbij kunnen ook bloedingen in de mond en in de darmen optreden. Gele koorts is een ernstige ziekte die in ongeveer 60% van de gevallen een dodelijke afloop heeft (3). Een antiviraal middel tegen de ziekte is niet beschikbaar. Een effectieve langdurige bescherming is echter wel mogelijk door middel van een vaccinatie met de geattenueerde YF-17D stam. Deze YFV stam is verzwakt door een serie mutaties die verspreid liggen over het gehele

genoom van het virus (2, 3, 4). De YF-17D stam is 65 jaar geleden ontwikkeld en meer dan 350 miljoen mensen zijn er inmiddels mee gevaccineerd (5).

#### *West Nile virus (WNV)*

Ook het West Nile virus behoort tot de familie van de *Flaviridae*. Dit positief strengs RNA virus werd in 1937 voor het eerst ontdekt in Oeganda en daarna werd het ook gesignaleerd in andere delen van Afrika, West-Azië, Oost-Europa en het Midden Oosten. In 2002 is er een uitbraak van het virus geweest in New York en sindsdien verspreidt de ziekte zich verder in de Verenigde Staten. Het virus komt voor bij mensen, vogels en andere gewervelde dieren zoals katten, paarden, vleermuizen, wangzakeekhoorns en konijnen. Verspreiding van het virus vindt voornamelijk plaats via muggen (*Culex spp.*) terwijl trekvogels een van de belangrijkste reservoirs vormen (6).

Een infectie met WNV veroorzaakt symptomen als lichte koorts, hoofdpijn, pijn, huiduitslag en gezwollen lymfeklieren. In enkele gevallen komt het virus in de hersenen terecht en kan het lethale encefalitis veroorzaken. Voornamelijk mensen boven de vijftig lopen hierop een verhoogd risico. Een vaccin of effectieve profylaxe tegen het WNV is niet beschikbaar.

#### *Voorgenomen werkzaamheden*

De aanvrager voert experimenten uit waarbij gebruik wordt gemaakt van de humane geattenueerde vaccinstam YF-17D. In deze stam zijn vervolgens de structurele genen prM en E uitgewisseld met de overeenkomstige genen van het WNV. De prM en E genen coderen voor oppervlakte eiwitten die een essentiële rol spelen bij de immuniteit tegen het WNV (7,8,9). Het recombinante vaccin YF-WNV is in de Verenigde Staten ontwikkeld, getest en vervaardigd. In Nederland zal het vaccin volgens Europese richtlijnen getest worden op veiligheid en werkzaamheid in muizen en paarden. De dieren worden ingeënt met het recombinante virus YF-WNV en vervolgens klinisch geobserveerd waarbij gekeken wordt naar ziekteverschijnselen en voornamelijk encefalitis. Na vier tot zes weken zullen de gevaccineerde dieren geïnfecteerd worden met een virus isolaat van het WNV om de beschermende werking van het vaccin aan te tonen.

#### **Eerdere COGEM adviezen**

In 2003 heeft de COGEM een advies uitgebracht over bovengenoemde werkzaamheden. YFV en WNV zijn beide virussen van pathogeniteitsklasse 3, terwijl de geattenueerde vaccinstam YF-17D een klasse lager wordt ingeschaald. De COGEM was van mening dat er onvoldoende gegevens waren aangeleverd over de mogelijke effecten van de insertie van de oppervlakte eiwitten van het WNV in de YF-17D stam. Gegevens over de

genetische stabiliteit, weefseltropisme en replicatie ontbraken waardoor geen uitsluitend gegeven kon worden dat de insertie mogelijk een verandering van tropisme en replicatie tot gevolg zou kunnen hebben. De COGEM adviseerde daarom destijds de voorgenomen werkzaamheden uit te voeren op ML-III niveau.

### **Aanvullende aangeleverde gegevens**

Naar aanleiding van nieuwe gegevens die betrekking hebben op genetische stabiliteit, weefseltropisme en replicatiekinetiek verzoekt de aanvrager tot omlaagschaling van de laboratoriumwerkzaamheden naar ML-II niveau.

De aanvrager verwijst naar een aantal studies die betrekking hebben op het replicatiepatroon en weefseltropisme van de recombinante YF-WNV vaccinstam. Het gaat om twee studies van Intervet International B.V. De eerste studie is uitgevoerd in Florida (VS) waarbij paarden ingespoten zijn met een hoge dosis YF-WNV waarna de viraemie en uitscheiding van het virus werd gecontroleerd. Histologisch onderzoek toonde aan dat het virus zich niet verspreid had naar andere weefsels. Bovendien kon het virus niet gereïsoleerd worden uit bloed, secreta monsters of weefselmonsters van de paarden. Hieruit wordt geconcludeerd dat de vervanging van de prM en E genen in YF-17D niet heeft geleid tot een veranderd weefseltropisme. Een tweede studie van Intervet International B.V. in muizen en de eerder aangeleverde studies in apen en vogels bij de aanvraag in 2003 leidt tot dezelfde conclusie.

Daarnaast presenteert de aanvrager de resultaten van een studie naar de genetische stabiliteit van het YF-WNV virus gedurende vijf passages in celcultuur. Met latere passages dan 5 zal in dit onderzoek niet gewerkt worden. De originele studies zijn niet toegevoegd aan de aanvullende informatie. De aanvrager heeft de genotypische stabiliteit van het YF-WNV getest door middel van een sequentie analyse op passage 0 en 5. De sequentie van het WNV-insert alsmede de flankerende regio's zijn vergeleken op passage 0 en 5 en leverden een homologie van 99,7% op. Van vijf van de 2128 nucleotiden in het genoom van passage 0 kon de identiteit niet vastgesteld worden, waardoor het verschil van 0,3% ontstond. De sequentie van het virus vaccin na passage vijf is daarnaast vergeleken met de sequentie van het originele construct zoals dat door Acambis Inc. ontwikkeld is. Deze vergelijking leverde een homologie van 100% op, waaruit geconcludeerd wordt door de aanvrager dat de sequentie stabiel is gebleven gedurende de 5 passages. De genetische stabiliteit bij in vivo seriële passage kon niet worden getest omdat het niet mogelijk bleek het virus te reïsoleren uit monsters van paarden.

Naast de genotypische stabiliteit heeft de aanvrager een studie uitgevoerd naar de fenotypische stabiliteit van het recombinante YF-WNV. Om de fenotypische stabiliteit te

testen is een aantal virus plaques van het envelop eiwit (E) van WNV vergeleken in passage 0 en 5 met behulp van een monoclonaal antilichaam specifiek voor E van WNV. Ter controle werd de vaccinstam YF-17D meegenomen. Uit deze studie blijkt dat de mate van expressie van E nagenoeg hetzelfde is voor passage niveaus 0 en +5 en dat het recombinant YF-WNV fenotypisch stabiel is gedurende deze passages.

De COGEM merkt bij de fenotypische analyse overigens op dat dit alleen aantoont dat in de onderzochte passages het E-eiwit van WNV tot expressie komt, en meer specifiek de epitootop die door het gebruikte antilichaam wordt herkend. Fenotypische veranderingen in het E-eiwit die anders zijn dan in de betreffende epitootop kunnen door middel van deze test niet gedetecteerd worden.

### **Overweging en advies**

De COGEM is van mening dat de aangeleverde gegevens voldoende aantonen dat YF-WNV in apen, muizen en paarden net zo geattenuëerd is als de vaccinstam YF-17D. Uit een artikel van Johnson (8) blijkt bovendien dat de recombinante vaccinstam YF-WNV slechts zeer beperkt in staat is tot replicatie (na intrathoracale inoculatie) in bepaalde soorten muggen, die als mogelijke vector voor het virus zouden kunnen dienen. Orale infectie met het recombinant YF-WNV was niet succesvol. Hieruit concludeert de COGEM dat de kans op verspreiding van YF-WNV via muggen verwaarloosbaar klein is.

De originele studies naar de genetische stabiliteit van het YF-WNV zijn niet bijgeleverd in de aanvraag. De aanvrager presenteert uitsluitend de resultaten van deze studie. Hoewel de COGEM van mening is dat de presentatie van de gegevens ten aanzien van de genetische stabiliteit enkele onduidelijkheden bevat, concludeert zij op basis van deze gegevens dat het recombinante YF-WNV genetisch stabiel is gedurende vijf passages in celcultuur. De aanvrager geeft aan dat een vijftal nucleotiden in passage 0 niet identificeerbaar bleek. Deze mogelijke puntmutaties bleken echter in de YF-17D insert te zitten en niet in de backbone, die de pathogeniteit en verspreidingskarakteristieken bepaald. Daarnaast leverde een vergelijking van het virusconstruct na passage 5 met het originele construct dat door Acambis Inc. ontwikkeld is 100% homologie op. Derhalve acht de COGEM het aannemelijk dat het recombinante YF-WNV genotypisch stabiel is gedurende de vijf passages.

De COGEM wijst er bovendien op dat het YF-WNV vaccin sinds 2006 geregistreerd is bij de APHIS/USDA en toegelaten is als levend vaccin in de Verenigde Staten.

### **Conclusie**

De oudervirussen YF-17D en WNV kunnen zich niet via aërosolen verspreiden en de COGEM acht het niet aannemelijk dat het recombinante virus dit wel zou kunnen. De

aangeleverde studies tonen bovendien aan dat het recombinante virus tenminste net zo geattenuëerd is als de YF-17D ouderstam die al geruime tijd als vaccin wordt toegepast en dat het YF-WNV slecht repliceert in zowel zoogdieren als vogels. Indien een medewerker ten gevolge van een prik accident zichzelf zou infecteren met de vaccinstam YF-WNV, acht de COGEM de kans op het ontstaan van een ziektebeeld verwaarloosbaar klein. Dierexperimenten in apen tonen aan dat er geen ziektebeeld ontstaat ten gevolge van injectie met de YF-17D of de YF-WNV vaccinstam. Uit het artikel van Johnson (8) blijkt bovendien dat de kans dat het virus zich vervolgens verder zou kunnen verspreiden via muggen verwaarloosbaar klein is.

De laboratoriumwerkzaamheden kunnen naar het inzicht van de COGEM veilig worden uitgevoerd op ML-II niveau met inachtneming van de voorgestelde aanvullende voorschriften, te weten het dragen van handschoenen en het uitvoeren van open handelingen in een veiligheidskabinet klasse II. De COGEM is van mening dat de veiligheid voor mens en milieu middels deze indeling voldoende gewaarborgd blijft.

### **Referenties**

1. Van Regenmortel M.H.V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego
2. Arya S.C. (2002). Yellow fever vaccine safety: a reality or a myth? *Vaccine* 20, 3627-8.
3. Monath T.P. (2001). Yellow fever: an update. *Lancet Infectious Disease* 1, 11-20
4. dos Santos C.N, Post P.R, Carvalho R, Ferreira I.I, Rice C.M. and Galler R. (1995). Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. *Virus Research* 35, 35-41
5. CDC. Internet: [www.cdc.gov/ncidod/dvbid/yellowfever/index.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/yellowfever/index.htm) (juli 2007)
6. Grant L. et al (2002). West Nile virus. *Lancet Infectious Disease* 2, 519-529
7. Arroyo J, Miller C.A, Catalan J, and Monath T.P. (2001). Yellow fever vector live-virus vaccines: West Nile virus vaccine development. *Trends in Molecular Medicine* 7, 350-4
8. Johnson B.W, Chambers T.V, Crabtree M.B, Arroyo J, Monath T.P, and Miller B.R. (2003). Growth characteristics of the veterinary vaccine candidate ChimeriVax trade mark -West Nile (WN) virus in *Aedes* and *Culex* mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology* 17, 235-43
9. Langevin S.A, Arroyo J, Monath T.P, and Komar N. (2003). Host-range restriction of chimeric yellow fever-West Nile vaccine in fish crows (*Corvus ossifragus*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69, 78-80