

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

DATUM 24 april 2013
KENMERK CGM/130424-01
ONDERWERP Advies: Reassortanten van *Influenza B virus*

Geachte mevrouw Mansveld,


Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een aanvraag voor wijziging van vergunning IG 05-027 getiteld 'Het genereren van influenza A virus PR/8 in PER.C6 cellen middels Reverse Genetics' van Crucell Holland B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Influenza B virus* (FLUBV). Voor de ontwikkeling van vaccins wil de aanvrager een zogenaamd 'reverse genetics' systeem opzetten om FLUBV-deeltjes te produceren. Hiermee kunnen virusdeeltjes gemaakt worden met combinaties van gensegmenten van verschillende FLUBV-virusstammen, zogenaamde reassortanten. Ook wil de aanvrager de virale sequenties muteren die coderen voor de oppervlakte-eiwitten hemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA), om ook andere, van nature voorkomende, sequenties te creëren.

De COGEM verwacht niet dat de voorgestelde mutaties in de HA en NA genen van gg-FLUBV tot een relevante verandering in de virulentie, het tropisme, of de transmissie van FLUBV zullen leiden. Tegen virussen met van nature voorkomende mutaties in HA en NA bestaat daarnaast al immuniteit bij de mens. Reassortanten van FLUBV die de afgelopen decennia zijn voorgekomen, waren nooit meer ziekteverwekkend dan de uitgangsstammen. In het uiterste geval zullen volgens de COGEM de aangebrachte mutaties in gereassorteerde FLUBV-deeltjes leiden tot een FLUBV met een vergelijkbare fitness als die van van nature circulerende FLUBV stammen.

De COGEM acht de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein indien de productie van de beschreven gg-FLUBV-deeltjes op ML-II inperkingsniveau wordt uitgevoerd, met inachtneming van aanvullende voorschriften om de kans op besmetting te verkleinen. Hierbij adviseert de COGEM alle medewerkers tegen influenza B te laten vaccineren.



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

Reassortanten van *Influenza B virus*

COGEM advies CGM/130424-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Influenza B virus* (FLUBV). De aanvrager beschikt al over een 'reverse genetics' systeem om genetisch gemodificeerde (gg-) influenza A virussen te genereren met behulp van plasmiden. De aanvrager wil nu ook een 'reverse genetics' systeem opzetten voor influenza B virussen. Het systeem zal ingezet worden bij de ontwikkeling van vaccins. De geproduceerde virussen kunnen als geïnactiveerde vaccins worden gebruikt. Daarnaast zullen de gg-virussen gebruikt worden om therapeutische antilichamen tegen influenza B te testen.

Influenza B virus

Het influenzavirus, in de volksmond beter bekend als griepvirus, behoort tot de familie van *Orthomyxoviridae* en wordt onderverdeeld in drie genera, te weten *Influenzavirus A*, *B* en *C*.¹ Het genus *Influenzavirus B* bevat één species, het zogenaamde *Influenza B virus* (FLUBV). Dit type virus is voor het eerst geïsoleerd in 1940 en veroorzaakt regelmatig epidemieën. Net als *Influenza A virus* (FLUAV) veroorzaakt het FLUBV de voor griep kenmerkende verschijnselen als koorts, hoofdpijn, spierpijn, keelpijn en hoesten. Een FLUBV infectie resulteert in ziekte in met name kinderen en jong volwassenen.² Maar in sommige epidemieën treft het FLUBV ook ouderen.^{2,3} In tegenstelling tot FLUAV veroorzaakt het FLUBV geen pandemieën. Opmerkelijk is de observatie dat virusisolaten afkomstig van patiënten die hun huisarts bezochten met griepklachten, voornamelijk FLUBV betreffen, terwijl de virusisolaten afkomstig van patiënten die opgenomen waren in het ziekenhuis hoofdzakelijk FLUAV's betreffen.⁴ Dit suggereert dat het FLUAV over het algemeen een ernstigere ziekte veroorzaakt dan het FLUBV.

Het FLUBV infecteert hoofdzakelijk mensen en vormt geen bedreiging voor (pluim)vee. Er is toenemend bewijs dat FLUBV ook voorkomt in zeehonden en oorrobber.^{5,6} Op dit moment is er echter geen dierreservoir vastgesteld voor FLUBV.

Een infectie met een FLUBV kan behandeld worden met antivirale middelen, zoals zanamivir en oseltamivir, hoewel er af en toe een FLUBV wordt geïdentificeerd die resistent is tegen deze antivirale middelen.⁷ Tegenwoordig bevatten griepvaccins naast twee FLUAV componenten, standaard één FLUBV component.⁸

Het FLUAV wordt onderverdeeld in verschillende subtypen op basis van de antigenen verschillen tussen de oppervlakte eiwitten hemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA). Daarentegen is er voor het FLUBV slechts 1 subtype bekend, alhoewel er wel twee antigenen verschillende lijnen worden onderscheiden. Het betreft de B/Victoria lijn, die wereldwijd circuleerde in de jaren tachtig en de B/Yamagata lijn, die dominant aanwezig was in de eerste helft van de jaren negentig.^{9,10}

Genomische organisatie van Influenza B virus

Het FLUBV heeft een negatief-strengig RNA genoom dat bestaat uit acht unieke genoomsegmenten. Het genoom codeert voor elf verschillende eiwitten. Dit zijn de polymerase eiwitten PB1, PB2 en PA, hemagglutinine (HA), nucleoproteïne, neuraminidase (NA), een membraaneiwit, een matrixeiwit, een ionkanaal en de niet-structurele eiwitten NS1 en NS2. Net zoals bij FLUAV, spelen de HA en NA eiwitten van FLUBV een belangrijke rol bij de gastheerspecificiteit en de aanmaak van antistoffen tegen het virus.¹¹

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil met behulp van reverse genetics FLUBV virusdeeltjes produceren. Daartoe worden acht plasmiden, die coderen voor de acht influenzavirus gensegmenten, getransfecteerd in animale cellen.¹² Er zullen helperplasmiden worden gecotransfecteerd om de polymerase componenten van het virus te produceren.

De aanvrager wil reassortanten vervaardigen, die gensegmenten van verschillende influenza B virussen bevatten. Om een B/Yamagata-type 6:2 reassortant te maken zal de aanvrager HA en NA van B/Yamagata virussen combineren met de zes overige gensegmenten van B/Florida/04/2006. Ook is de aanvrager van plan 7:1 reassortanten te maken in de achtergrond van B/Florida, die alleen het HA gensegment van een B/Yamagata virus zullen bevatten. Dezelfde aanpak zal gehanteerd worden voor reassortanten binnen de B/Victoria antigene lijn. Hierbij zullen HA en/of NA van B/Victoria virussen in de achtergrond van B/Malaysia/2506/2004 tot expressie gebracht worden. De achtergrondstammen B/Florida/04/2006 en B/Malaysia/2506/2004 zijn volgens de aanvrager recent gebruikt in influenza vaccins.

In de HA en NA gensequenties van B/Yamagata en B/Victoria zullen mutaties aangebracht worden om ook andere, van nature voorkomende, sequenties te creëren. Daarnaast kunnen er mutaties worden aangebracht in de oppervlakte-eiwitten HA en NA, met het doel de epitopen van de virussen in kaart te brengen. Verder wil de aanvrager de mogelijkheid hebben om reassortanten tussen de B/Victoria- en B/Yamagatalijnen te maken, indien een van de voorziene productiesystemen niet efficiënt genoeg werkt.

Eerder COGEM advies

Recent heeft de COGEM geadviseerd dat *Influenza B virus* als een klasse 2 pathogeen beschouwd kan worden, omdat het virus geen griep пандемієën veroorzaakt, en omdat er vaccins en antivirale middelen tegen bestaan.¹³ Het advies betrof ook werkzaamheden met gg-FLUBV waarvan het HA eiwit zo is gemuteerd, dat er geen glycosylering van het HA meer kan plaatsvinden. De COGEM achtte de kans verwaarloosbaar klein dat deglycolysing van het HA eiwit van FLUBV tot een hoger gastheerbereik zal leiden. Bovendien zullen de aan te brengen mutaties hoogstwaarschijnlijk al in de natuur voorkomen.

Overweging

De aanvrager is voornemens influenza B reassortanten te maken, die mogelijk gemuteerde HA en NA sequenties bevatten. De mutaties die de aanvrager wil aanbrengen zullen, met uitzondering van de mutaties voor ‘epitope mapping’, versies van HA en NA creëren die al van nature voorkomen.

Influenza B komt algemeen voor bij mensen en leidt bij infectie tot gewone griepverschijnselen, maar veroorzaakt geen ernstige ziekte. Tot op heden zijn er geen hoogpathogene FLUBV's geïdentificeerd, en zijn er geen pandemieën door FLUBV veroorzaakt. Genetische reassortering tussen FLUAV en FLUBV is in de praktijk niet mogelijk.¹⁴ Er zijn vaccins tegen FLUBV beschikbaar en een infectie is te behandelen met antivirale middelen. In de huidige Nederlandse griepvrij zijn altijd geïnactiveerde virusdeeltjes van één van de twee antigene influenza B lijnen opgenomen.

FLUBV heeft een hoge mutatiesnelheid, hoewel deze minder hoog is dan van FLUAV. Er bestaat een sterke natuurlijke selectie op veranderingen in antigene eigenschappen van het virus. Vanwege de aanwezige immuniteit in de populatie, kunnen slechts de stammen met de hoogste fitness tijdens het griepseizoen een epidemie veroorzaken. Tegen virussen met mutaties die al van nature in HA en NA zijn voorgekomen, zal immuniteit bestaan in de populatie. Daarnaast zijn deze (combinaties van) mutaties minder relevant, door het ontstaan van andere antigene eigenschappen in FLUBV. De COGEM verwacht niet dat de voorgestelde mutaties in de HA en NA genen van gg-FLUBV tot een relevante verandering in de virulentie, het tropisme, of de transmissie van FLUBV zullen leiden.

Alle varianten van het *Influenza B virus* die de afgelopen decennia zijn voorgekomen in de natuur zijn, voor zover bij de COGEM bekend, vergelijkbaar in virulentie, tropisme of transmissie. Dit is ook het geval voor gereassorterd FLUBV dat zowel B/Victoria als B/Yamagata gensegmenten bevat.¹⁵ Omdat verschillen in virulentie tussen FLUBV stammen voornamelijk berusten op mutaties in genen anders dan HA en NA, is het onwaarschijnlijk dat het uitwisselen van HA en/of NA tussen de twee antigene FLUBV lijnen een verhoogde fitness veroorzaakt. Het aanbrengen van mutaties in een influenzavirus met behulp van reverse genetics kan in de meeste gevallen tot attenuering van het virus leiden, vooral als dit in een gereassorterd virus gebeurt. In het uiterste geval zullen volgens de COGEM de aangebrachte mutaties tot een FLUBV virus leiden met een vergelijkbare fitness als die van van nature circulerende virussen.

Advies

Omdat de COGEM de kans verwaarloosbaar klein acht dat er bij de voorgenomen werkzaamheden FLUBV zal ontstaan met een hogere fitness dan die van van nature circulerende stammen, adviseert de COGEM de voorgenomen productie van gg-FLUBV op ML-II inperkingsniveau uit te voeren. Hierbij worden aanvullende voorschriften geadviseerd, waaronder vaccinatie.

Bij werkzaamheden met influenza adviseert de COGEM vaccinatie van medewerkers, om te voorkomen dat zij drager zijn van wildtype influenzavirussen en er vervolgens reassortment optreedt tussen een wildtype influenzavirus en een gg-influenzavirus.¹⁶ Wanneer medewerkers niet gevaccineerd (kunnen) worden en zij werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau uitvoeren, adviseert de COGEM het dragen van een mondkapje (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2). De COGEM geeft echter voorkeur aan vaccinatie, omdat dit ook bescherming biedt bij andere werkzaamheden met influenzavirussen.

De COGEM adviseert verder de volgende aanvullende voorschriften om verspreiding van influenzavirussen te voorkomen:

- Open handelingen moeten uitgevoerd worden in een veiligheidskabinet klasse-II,
- Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden,
- Het dragen van handschoenen is verplicht.

Onder genoemde inperkingsniveaus en de aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's van deze handelingen voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. McCauley JW *et al.* (2012). The Negative Sense Single Stranded RNA viruses; family Orthomyxoviridae. In: Virus Taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Edited by King AMQ *et al.* Elsevier Academic Press, Amsterdam 749-61
2. Thompson WW *et al.* (2003) Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in de United States. JAMA 289: 179-86
3. Ohmit SE *et al.* (1995). Influenza vaccin effectiveness in preventing hospitalization among the elderly during influenza type A en type B seasons. Int J. Epidemiol. 24: 140-8
4. Claas EC *et al.* (1995). Influenza types and patient population. Lancet 346: 180
5. Osterhaus ADME *et al.* (2000). *Influenza B virus* in Seals. Science 288: 1051-3
6. Blanc A *et al.* (2009). Serologic evidence of Influenza A and B viruses in South American fur seals (*Arctocephalus australis*) J Wildlife dis. 45: 519-21
7. CDC Antiviral Drug-resistance among Influenza viruses
<http://www.cdc.gov/flu/professionals/antivirals/antiviral-drug-resistance.htm> (16 januari 2013)
8. Belshe RB (2010). The need for quadrivalent vaccine against seasonal influenza. Vaccine 28 suppl 4: D45-53
9. Shaw MW *et al.* (2002). Reappearance and global spread of variants of influenza B/Victoria/2/87 lineage viruses in the 2000-2001 and 2001-2002 seasons. Virology 303:1-8
10. McCullers J *et al.* (2004). Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003 J. Vir. 23: 12817-28
11. Brown EG *et al.* (2000). Influenza virus genetics. Biomed Pharmacother 54: 196-209
12. Hoffman E *et al.* (2002). Rescue of *Influenza B virus* from eight plasmids . PNAS 99: 11411-6
13. COGEM (2013). Classificatie van en werkzaamheden met *Influenza B virus*. Advies CGM/130118-01
14. Ghenkina DB & Ghendon YZ (1979). Recombination and complementation between orthomyxoviruses under conditions of abortive infection Acta Virol. 23: 97-106
15. Chen R & Holmes EC (2008). The evolutionary dynamics of human *Influenza B virus*. J Mol Evol 66:655-663
16. COGEM (2006). Aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde influenza A virussen. Advies CGM/061214-01