

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 15 oktober 2015
KENMERK CGM/151015-01
ONDERWERP Advies: Inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd
Japanese encephalitis virus

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag met de titel '*Het gebruik van verzwakt Japanese encephalitis virus voor het maken van vaccins*' van Intravacc, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd (gg-) *Japanese encephalitis virus* (JEV). Het betreft een variant van een levend verzwakte vaccinstam genaamd SA₁₄-14-2.

JEV is een virus dat hoofdzakelijk voorkomt in Zuid- en Zuidoost Azië en delen van Australië. Het virus kan via geïnfecteerde muggen overgedragen worden naar de mens waar het een hersenontsteking (virale encefalitis) kan veroorzaken. In Azië komt deze ziekte jaarlijks bij meer dan 50.000 mensen voor. Bij kwetsbare bevolkingsgroepen, zoals ouderen en kinderen, kan een infectie zeer ernstige gevolgen hebben. Er bestaat op dit moment nog geen geneesmiddel tegen virale encefalitis. Er zijn echter wel verschillende vaccins beschikbaar om een infectie met JEV te voorkomen.

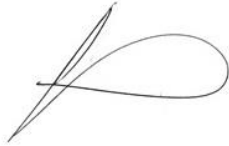
De aanvrager wil voor de werkzaamheden gebruik maken van een variant van de vaccinstam SA₁₄-14-2. Deze vaccinstam wordt al meer dan twintig jaar toegepast en is inmiddels aan meer dan 300 miljoen Chinese kinderen toegediend. In het afgelopen decennium kwam SA₁₄-14-2 ook in andere Aziatische landen op de markt, waaronder Zuid-Korea, Nepal, India en Thailand. Tot op heden zijn er geen meldingen gemaakt van vaccin gerelateerde bijwerkingen. Ook is er geen bewijs gevonden voor reversie van de vaccinstam naar het wildtype virus. De gg-variant genaamd SA₁₄-14-2^{MCV} is vrijwel identiek aan SA₁₄-14-2 met uitzondering van een stille puntmutatie. De COGEM is van mening dat deze puntmutatie geen effect heeft op de virulentie van het virus.

Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van mening dat JEV variant SA₁₄-14-2^{MCV} verzwakt is. De COGEM stemt in met inschaling van de werkzaamheden met SA₁₄-14-2^{MCV} op ML-II inperkingsniveau en is van mening dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden 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. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Japanese encephalitis virus*

COGEM advies CGM/151015-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd (gg-) *Japanese encephalitis virus* (JEV). Het betreft een variant van de levend verzwakte vaccinstam JEV SA₁₄-14-2. De aanvrager wil onderzoeken of deze gg-variant genaamd JEV SA₁₄-14-2^{MCV} kan repliceren op Vero cellen. Daarnaast wil de aanvrager onderzoek doen naar manieren om het virus te zuiveren en te concentreren.

Japanese encephalitis virus

Het JEV behoort tot het genus *Flavivirus* binnen de familie *Flaviviridae*.¹ Binnen het genus is JEV het *prototype virus* van de *Japanese encephalitis serogroup* waartoe ook andere klinisch belangrijke virussen behoren, zoals *West Nile virus*, *St Louis encephalitis virus* en *Murray Valley encephalitis virus*.^{1,2} Het virus is nauw verwant aan *Yellow fever virus* (YFV) en *Dengue virus* (DENV).²

JEV heeft een positief enkelstrengs RNA genoom van circa 11 kilobasen. Het RNA codeert voor één groot polyproteïne dat door virale en cellulaire proteasen wordt opgedeeld in drie structurele eiwitten (C, prM en E) en zeven niet-structurele eiwitten (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B en NS5). Het nucleocapside eiwit (C) omhult het RNA en de overige twee structurele eiwitten prM en E vormen samen met het gastheermembraan de envelop. De NS-genen zijn onder andere betrokken bij RNA replicatie en de vorming van nieuwe virusdeeltjes.^{3,4}

Op basis van fylogenetische analyses van het envelopeiwit E worden er vijf genotypen van JEV onderscheiden (I t/m V).⁸ Genotype III is het dominante genotype dat in verband wordt gebracht met humane infecties.⁵

Virale encefalitis

JEV komt hoofdzakelijk voor in Zuid- en Zuidoost Azië en in delen van Australië. Watervogels en varkens vormen de primaire reservoirs voor het virus. In endemische gebieden circuleert het virus in een enzoötische cyclus tussen steekmuggen uit het geslacht *Culex* (in het bijzonder *Culex tritaeniorhynchus*), watervogels en varkens.⁶ Paarden en mensen zijn incidentele *dead-end* gastheren die het virus niet verder verspreiden. Transmissie van JEV naar de mens vindt plaats via de beet van geïnfecteerde muggen.⁶

Een infectie met JEV verloopt veelal asymptomatisch. JEV is echter de belangrijkste veroorzaker van virale encefalitis in Azië met een geschatte incidentie van meer dan 50.000 klinische gevallen

per jaar.⁷ In Europa komt Japanse encefalitis vooral voor bij reizigers die JEV-endemische en epidemische gebieden hebben bezocht.⁸

De eerste symptomen van Japanse encefalitis ontstaan na een incubatietijd van ongeveer vijf tot vijftien dagen.⁶ De meeste patiënten ontwikkelen enkel een voorbijgaande koorts.⁸ Bij kwetsbare bevolkingsgroepen, zoals ouderen en kinderen, kan de infectie zich verder ontwikkelen tot meningitis, encefalitis of myelitis.⁸ De symptomen kunnen bestaan uit hoofdpijn, stijve nek gevolgd door coma, convulsies, verlamningsverschijnselen en bewegingsstoornissen. Ongeveer 30 tot 50 procent van de patiënten met neurologische verschijnselen sterft uiteindelijk. Patiënten die overleven houden neurologische schade in de vorm van een Parkinsonachtig syndroom.⁸

Er bestaat op dit moment nog geen geneesmiddel tegen virale encefalitis. De behandeling is vooral gericht op verlichting van ernstige klinische symptomen. Er zijn wel verschillende vaccins beschikbaar om een infectie met JEV te voorkomen.^{2,5}

JEV vaccins

Wereldwijd zijn er verschillende humane JEV vaccins op de markt gebracht, waaronder JE-VAX (*mouse brain-derived killed-inactivated*), SA14-14-2 (*cell culture-derived live-attenuated*), IXIARO (*cell culture-derived killed-inactivated*) en IMOJEV (*genetically engineered live-attenuated chimeric*).²

JE-VAX is gebaseerd op de zogenoemde Nakayama stam die in 1935 uit de hersenen van een Japanse encefalitis patiënt werd geïsoleerd. Het vaccin werd geproduceerd door zogende muizen intracerebraal te inoculeren met het virus en het homogenaat afkomstig uit de hersenen te inactiveren met formaline. Vervolgens werd het geïnactiveerde virus opgezuiverd met behulp van ultracentrifugatie.

JE-VAX was decennia lang het enige commercieel verkrijgbare JE vaccin wereldwijd. Productie van het vaccin stopte in 2006 vanwege onder andere vaccin gerelateerde bijwerkingen, hoge productiekosten en de beschikbaarheid van nieuwe en verbeterde JE vaccins.²

SA14-14-2 is gebaseerd op de virulente SA₁₄ stam die in 1954 werd geïsoleerd uit *Culex pipiens* muggenlarven in China. De levend geattenueerde vaccinstam SA₁₄-14-2 werd geproduceerd door seriële passage van de SA₁₄ stam in *primary hamster kidney* (PHK) cellen en dieren (muizen en hamsters) in combinatie met plaque purificatie in PHK of *primary chick embryo* (PCE) cellen. Het vaccin genaamd SA14-14-2 kwam in 1988 in China op de markt en wordt tegenwoordig geproduceerd in PHK cellen. Sinds de markttoelating is het vaccin aan meer dan 300 miljoen Chinese kinderen toegediend.⁴

In het afgelopen decennium kwam SA14-14-2 ook in andere Aziatische landen op de markt, waaronder Zuid-Korea, Nepal, India en Thailand. SA14-14-2 is op dit moment het meest gebruikte JE vaccin in JE endemische gebieden.²

In 2009 werd IXIARO toegelaten tot de Europese en Amerikaanse markt. Dit vaccin bestaat uit een geïnactiveerde SA₁₄-14-2 stam. De stam wordt gekweekt in Vero cellen, gezuiverd en vervolgens geïnactiveerd met formaline.⁹ Aanvankelijk was het vaccin alleen bedoeld voor mensen ouder dan zeventien jaar, maar sinds 2013 is het vaccin in Europa en Amerika ook goedgekeurd voor kinderen ouder dan twee maanden.²

Inmiddels is ook het eerste chimere vaccin geproduceerd (IMOJEV). Dit vaccin bestaat uit een levend verzwakte *Yellow fever virus* stam die de structurele eiwitten prM en E van de verzwakte SA₁₄-14-2 stam tot expressie brengt. Dit vaccin is commercieel verkrijgbaar in Australië en Thailand.²

Voorgenomen werkzaamheden

In het kader van vaccinproductie wil de aanvrager onderzoeken of een variant van de levend geattenueerde JEV stam SA₁₄-14-2 genaamd SA₁₄-14-2^{MCV} kan repliceren in Vero cellen. Deze variant is geproduceerd via *reverse genetics*.⁴ Daarnaast wil de aanvrager onderzoek doen naar manieren om het SA₁₄-14-2^{MCV} virus te zuiveren en te concentreren. De aanvrager wil de werkzaamheden op ML-II niveau uitvoeren. Hij geeft verder aan dat de medewerkers voorafgaand aan het werk gevaccineerd zullen worden.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over werkzaamheden met gg-JEV. In 2013 heeft de COGEM het wildtype virus ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.¹⁰ Ook in België, Duitsland, Frankrijk, Zwitserland en Amerika wordt het wildtype virus beschouwd als een klasse 3 pathogeen.^{11,12,13,14,15}

Overweging en advies

De aanvrager wil werkzaamheden uitvoeren met een variant van de levend verzwakte vaccinstam SA₁₄-14-2 genaamd SA₁₄-14-2^{MCV}. De volledige sequentie van vaccinstam SA₁₄-14-2 is bekend en beschreven.¹⁶ Deze vaccinstam bevat 17 mutaties ten opzicht van wildtype stam SA₁₄, waarbij meerdere mutaties in E, UTR, C en NS1, de neuro-invasie en neurovirulentie van het virus verzwakken.^{3,17} Reversie naar wildtype is alleen mogelijk als een groot aantal mutaties hersteld wordt.

Variant SA₁₄-14-2^{MCV} is identiek aan de vaccinstam met uitzondering van een stille puntmutatie op positie 9134 in het genoom van SA₁₄-14-2^{MCV} (A→T). Deze mutatie dient als marker.⁴ De COGEM is van mening dat deze puntmutatie geen effect heeft op de virulentie van het levend verzwakte virus.

Stam SA₁₄-14-2 wordt al jarenlang op grote schaal toegepast als levend verzwakt vaccin in Azië en heeft een goed veiligheidsprofiel. Het vaccin is al aan meer dan 300 miljoen Chinese kinderen toegediend. In het afgelopen decennium kwam SA₁₄-14-2 ook in andere Aziatische landen op de markt, waaronder Zuid-Korea, Nepal, India en Thailand. Tot op heden zijn er geen meldingen

gemaakt van vaccin gerelateerde bijwerkingen. Ook is er geen bewijs gevonden voor reversie naar wildtype SA₁₄.

De kans op besmetting van laboratoriummedewerkers is klein, omdat het virus voor transmissie afhankelijk is van een muggenvector. In het geval medewerkers toch worden besmet, zijn de risico's verwaarloosbaar klein, omdat het gg-virus vrijwel identiek is aan de levend verzwakte vaccinstam SA₁₄-14-2. In het theoretische geval dat er klinische verschijnselen optreden, kan het virus zich niet verder verspreiden, omdat de mens een *dead-end host* is.

Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van mening dat JEV variant SA₁₄-14-2^{MCV} geattenueerd is. De COGEM stemt in met inschaling van de werkzaamheden met SA₁₄-14-2^{MCV} op ML-II inperkingsniveau en is van mening dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Simmonds, P *et al.* (2012). Family *Flaviviridae*. In *Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
2. Yun SI & Lee YM (2014). Japanese encephalitis: the virus and vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 10: 263-279
3. Gromowski GD *et al.* (2015). Genetic Determinants of Japanese Encephalitis Virus Vaccine Strain SA14-14-2 That Govern Attenuation of Virulence in Mice. *J Virol.* 89: 6328-6337
4. Yun SI *et al.* (2014). A molecularly cloned, live-attenuated japanese encephalitis vaccine SA14-14-2 virus: a conserved single amino acid in the *ij* Hairpin of the Viral E glycoprotein determines neurovirulence in mice. *PLoS Pathog.* 10: e1004290
5. Trent DW *et al.* (2013). WHO working group on the quality, safety and efficacy of japanese encephalitis vaccines (live attenuated) for human use, Bangkok, Thailand, 21-23 February 2012. *Biologicals.* 41: 450-457
6. Halstead SB *et al* (2011). New Japanese encephalitis vaccines: alternatives to production in mouse brain. *Expert Rev Vaccines.* 10(3): 355-364.
7. World Health Organization (2014). Japanese encephalitis. Factsheet No 386. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs386/en/ (bezocht: 6 oktober 2015)
8. Cleton N *et al.* (2013). Japanese encephalitis in Zuid-Europa? *Ned. Tijdschr. Med. Microbiol* 21:1
9. Jelinek T (2013). IXIARO updated: overview of clinical trials and developments with the inactivated vaccine against Japanese encephalitis. *Expert Rev Vaccines.* 12: 859-69
10. COGEM (2013). Classificatie humaan- en dierpathogene RNA virussen. COGEM advies CGM/131031-02
11. Wetenschappelijk Instituut voor de Volksgezondheid/ Institut Scientifique de Santé Public (WIV-ISP) (2008). List of viruses and unconventional agents presenting at the wild state a biological risk for immunocompetent humans and/or animals and corresponding maximum biological risk. www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_virus.pdf (bezocht: 7 oktober 2015)

12. Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe, Einstufung von Viren in Risikogruppen (TRBA) (2012). Einstufung von Viren in Risikogruppen (TRBA 462). www.baua.de/cae/servlet/contentblob/672902/publicationFile/48593/TRBA-462.pdf (bezocht: 7 oktober 2015)
13. Haut Conseil des biotechnologies (2013). Manuel du HCB pour l'utilisation confinée d'Organismes Génétiquement Modifiés. www.hautconseildesbiotechnologies.fr/IMG/pdf/Manuel_HCB_utilisation_confinee_OGM.pdf (bezocht: 7 oktober 2015)
14. Federal Office for the Environment FOEN (2013). Classification of Organisms. Part 2: Viruses. Status January 2013 www.bafu.admin.ch/publikationen/publikation/01614/index.html?lang=en (bezocht: 7 oktober 2015)
15. American Type Culture Collection. www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/VR-343.aspx (bezocht 7 oktober 2015)
16. Japanese encephalitis virus strain SA14-14-2, complete genome www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JN604986 (bezocht: 7 oktober 2015)
17. Song BH *et al* (2012). Biological and genetic properties of SA₁₄-14-2, a live-attenuated Japanese encephalitis vaccine that is currently available for humans. *J Microbiol.* 50: 698-706