

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

DATUM 11 juli 2016
KENMERK CGM/160711-02
ONDERWERP Advies: Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Measles virus*

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van vergunningaanvraag IG 16-209_2.8-000 getiteld: 'Productie van recombinante mazelenvirussen' van HALIX B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Measles virus* (MeV) (mazelenvirus). De aanvrager wil twee gg-MeV varianten produceren waarin één of meerdere coderende sequenties van oppervlakte-eiwitten afkomstig van *Zika virus* (ZIKV) zijn geplaatst. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden op ML-II niveau te mogen uitvoeren.

De gg-MeV varianten worden gemaakt op basis van de sterk verzwakte vaccinstam Schwarz. De vaccinstam bevat ten opzichte van het wild-type MeV mutaties in bijna alle virale eiwitten. De vaccinstam Schwarz kent een lange historie van veilig gebruik.

De COGEM acht het onwaarschijnlijk dat het toevoegen van de ZIKV eiwitten de (gehele) verzwakking van de Schwarz stam teniet zal doen. In het theoretische geval dat dit wel gebeurt, zal het virus niet pathogener worden dan het wild-type MeV. Dit virus is geclassificeerd als een klasse 2 pathogeen.

Op basis van deze gegevens is de COGEM van mening dat de productiewerkzaamheden van de twee gg-MeV varianten op ML-II inperkingsniveau kunnen plaatsvinden.

Op genoemd inperkingsniveau acht de COGEM de risico's bij handelingen met de gg-MeVs 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

Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Measles virus*

COGEM advies CGM/160711-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Measles virus* (MeV - mazelenvirus). De vergunningaanvraag is ingediend door HALIX B.V.. De aanvrager wil replicatiecompetent gg-MeV produceren waarin naast de eigen oppervlakte-eiwitten, heterologe oppervlakte-eiwitten van *Zika virus* (ZIKV) tot expressie worden gebracht. De gg-virussen zijn afgeleid van de sterk verzwakte MeV vaccinstam Schwartz. De aanvrager wil gg-MeVs produceren, karakteriseren en zuiveren.

2. *Measles virus*

Het MeV is een zeer besmettelijk virus dat wordt verspreid via aërosolen. De klinische symptomen ontstaan ongeveer twee weken na infectie en bestaan uit koorts, hoesten, neusverkoudheid en bindvliesontsteking van het oog (conjunctivitis) gevolgd door karakteristieke uitslag. Daarnaast wordt mazelen geassocieerd met immuunsuppressie resulterend in toegenomen vatbaarheid voor opportunistische infecties.¹

Het MeV is, ondanks de beschikbaarheid van een veilig en kosteneffectief vaccin, jaarlijks verantwoordelijk voor aanzienlijke sterfte. In 2014 waren er wereldwijd 114.900 sterfgevallen als gevolg van mazeleninfecties. Meer dan 95% van de sterfgevallen vindt plaats in lage-inkomenslanden met een slecht ontwikkelde gezondheidszorg.² Een MeV infectie tijdens de zwangerschap kan een verhoogde kans geven op het overlijden van de foetus.³ Vaccinatie tegen mazelen is in Nederland opgenomen in het Rijksvaccinatieprogramma.⁴

2.1 *Measles virus* genoom

MeV behoort tot de familie *Paramyxoviridae*, genus *Morbillivirus*. Het virus wordt omgeven door een lipidemembraan en heeft een negatief enkelstrengs RNA genoom. Het genoom bevat zes genen die coderen voor de structurele eiwitten 'nucleocapside' (N), 'phospho' (P), 'matrix' (M), 'fusie' (F), 'haemagglutinin' (H) en 'large' (L) en de niet structurele eiwitten C en V.⁵

Het nucleocapside eiwit vormt samen met het RNA genoom en het RNA-afhankelijke RNA polymerase, bestaande uit de P en L eiwitten, een zogenaamd ribonucleoproteïne complex. Het M-eiwit bekleedt het binnenoppervlak van het lipidemembraan en is betrokken bij het vrijkomen van het virus uit de cel en de regulatie van de transcriptie. De glycoproteïnes H en F bevinden zich in het lipidemembraan en zijn verantwoordelijk voor de verankering aan, en fusie met de gastheercel.

2.2 *Levend-verzwakte mazelen vaccins*

MeV werd in 1954 voor het eerst geïsoleerd uit een celcultuur.⁶ Uit deze zogenoemde Edmonston wild-type MV stam werd de levend-verzwakte Edmonston-B vaccinstam geproduceerd die in 1963 op de markt kwam. Later werd deze stam onder meer opgevolgd door de meer verzwakte stammen Edmonston-Enders, Edmonston-Zagreb, Moraten en Schwarz.^{1,7,8} De Schwarz stam is in 1962

gemaakt door de Edmonston stam te kweken op kippenembryofibroblasten.⁹ Vanaf 1975 wordt de Schwarz stam gebruikt als vaccin tegen MeV.¹⁰

3. Zika virus

ZIKV behoort tot de familie *Flaviviridae* en het genus *Flavivirus*.¹¹ Een infectie met ZIKV verloopt doorgaans asymptomatisch, maar kan ook een milde ziekte veroorzaken die 3 tot 12 dagen duurt. Eén op de vier patiënten vertoont ziekteverschijnselen, waaronder (hoge) koorts, hoofdpijn, gewrichtspijn en huiduitslag. De ziekteverschijnselen lijken op die van griep, dengue en chikungunya.^{12,13} Tevens lijkt er een correlatie te bestaan tussen een doorgemaakte ZIKV-infectie en het syndroom van Guillain Barré (GBS) (aandoening van bepaalde motorische zenuwen).¹⁴

Aedes aegypti (Gele koortsmug) en *Aedes albopictus* (Aziatische tijgermug) zijn de belangrijkste transmissie-vectoren van ZIKV.¹⁵ De Gele koortsmug kan zich in Nederland niet handhaven, maar wordt net als de Aziatische tijgermug incidenteel geïmporteerd in Nederland.¹⁶ De Aziatische tijgermug is waarschijnlijk wel in staat om de Nederlandse winters te overleven. ZIKV kan ook overgedragen worden via seksueel contact.¹⁷ Daarnaast kan overdracht van moeder op kind tijdens de zwangerschap plaatsvinden. Op basis van de gegevens van de huidige ZIKV-epidemie blijkt er een correlatie te bestaan tussen een doorgemaakte ZIKV-infectie en afwijkingen aan het centrale zenuwstelsel (CZS) bij foetussen en pasgeborenen.¹⁸

In Nederland zijn tot nog toe ruim 60 gevallen van ZIKV geregistreerd. Het betreft allemaal mensen die het virus in het buitenland opgelopen hebben.¹⁹

Zika virus genoom

Zika virus (ZIKV) behoort tot het genus *Flavivirus*, familie *Flaviviridae*, en is een positief enkelstrengs RNA-virus. Het genoom van ZIKV is ongeveer 10,7 kb groot.^{20,21,22,23} Het genomisch RNA van de flavivirussen codeert voor één enkel polyproteïne en wordt aan weerszijden geflankeerd door een non-coding region ofwel non-translated region (NTR).^{24,25} Door splitsing van het polyproteïne worden drie structurele eiwitten (C, (pr)M en E) en zeven niet-structurele eiwitten (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B en NS5) gevormd.

Het nucleocapside (C) omhult het RNA. De andere twee structurele eiwitten ((pr)M en E) zijn oppervlakte-eiwitten en vormen samen met het gastheermembraan de envelop. Deze eiwitten spelen een rol bij de binding aan de cel en zijn betrokken bij de immuniteit tegen het virus. De NS-genen en de 5'- en 3'-NTRs zijn betrokken bij de translatie, replicatie en het inpakken van het RNA in het virusdeeltje. De NS-genen coderen voor helicase, polymerase of protease.²⁴ Virusreplicatie lijkt zowel in het cytoplasma, in zogenaamde auto-fagosomen, als in de celkern plaats te vinden.^{26,27} Wanneer geen NTRs aanwezig zijn of wanneer deze gemuteerd zijn, vindt er geen replicatie van het virusgenoom plaats.²⁵

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil twee varianten van gg-mazelenvirussen produceren die oppervlakte-eiwitten van ZIKV produceren. Hiervoor maakt hij gebruik van de MeV vaccinstam Schwarz waarin een ATU-site en een MeV promotor en terminator sequentie zijn geïntroduceerd tussen de genen die coderen

voor het P en M eiwit van MeV.¹⁰ De coderende sequentie van de ZIKV eiwitten worden op die plaats in het MeV geïntroduceerd. In de eerste gg-MeV variant wordt de coderende sequentie van een codon geoptimaliseerd 'soluble' envelope eiwit (sE) geïnsereerd. In de tweede gg-MeV variant (Zika RSP) worden de coderende sequenties van het (pr)M en een gemuteerd E eiwit geïnsereerd. Door de mutatie hoopt de aanvrager de fusie-activiteit van E te verminderen. De aanvrager wil beide gg-MeVs produceren, karakteriseren en zuiveren.

5. Eerder COGEM advies

In 2012 heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met het gg-mazelenvirussen die afgeleid waren van de vaccinstam Edmonston-Zagreb. In deze gg-virussen waren de oppervlakte-eiwitten van het mazelenvirus vervangen door die van *Human respiratory syncytial virus* (RSV) of het bofvirus (*Mumps virus*).²⁸ De COGEM concludeerde dat de uitgangsstam sterk verzwakt was en een historie van veilig gebruik kent waardoor de werkzaamheden op ML-II en DM-II inperkingsniveau uitgevoerd konden worden. Het mazelenvirus is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.²⁹

ZIKV is eerder dit jaar door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.³⁰ De productie van zogenaamde gg-ZIKV replicons adviseerde zij in te schalen op ML-II inperkingsniveau, omdat deze in staat zijn in cellen te repliceren, maar er geen autonoom replicerende virusdeeltjes gevormd kunnen worden. Werkzaamheden met volvirulent gg-ZIKV adviseerde zij conform de Regeling ggo in te schalen op ML-III inperkingsniveau.

6. Overwegingen

6.1 gg-MeV variant met sE

De aanvrager wil een gg-MeV variant produceren waarin de coderende sequentie van het sE eiwit van ZIKV aanwezig is. Deze MeV gg-variant is gebaseerd op de sterk verzwakte vaccinstam Schwarz. De Schwarz vaccinstam kent een lange historie van veilig gebruik. Het vaccin wordt sinds 1975 gebruikt als vaccin tegen MeV en is volgens de aanvrager sindsdien meer dan honderd miljoen keer gebruikt. Ten opzichte van het wild-type MeV zijn er mutaties aanwezig in bijna alle eiwitten, waaronder ook de eiwitten die betrokken zijn bij de remming van de anti-virale respons van de gastheer. Door de vele mutaties is de kans op reversie naar het wild-type MeV zeer klein.³¹

In deze gg-MeV variant is een codon geoptimaliseerde sE geïnsereerd van ZIKV. Het transmembraandeel van E is verwijderd waardoor het sE eiwit niet in de gg-MeV envelop van het virusdeeltje aanwezig zal zijn, maar uitgescheiden wordt door de cel. In studies met gg-MeV waarin sE eiwitten van de aan ZIKV verwante virussen *West Nile virus* of *Dengue virus* (beide genus *Flavivirus*) aanwezig waren, zijn geen effecten op de virulentie en pathogeniteit van deze gg-MeVs in doodshoofdaapjes of muizen gerapporteerd.^{32,33,34} Op basis van deze gegevens verwacht de COGEM dat tropisme, virulentie en pathogeniteit van het gg-MeV niet anders zal zijn dan die van de vaccinstam Schwarz.

6.2 Zika RSP

Voor de productie van Zika RSP, de tweede gg-MeV variant, is ook gebruik gemaakt van de MeV vaccinstam Schwarz. Het Zika RSP bevat de coderende sequentie voor de twee ZIKV eiwitten: (pr)M en een gemuteerde vorm van E. De (pr)M en E eiwitten van ZIKV vormen samen met het gastheermembraan de envelop van het ZIKV deeltje. Deze eiwitten spelen een belangrijke rol bij de binding aan de cel en zijn betrokken bij de immuniteit tegen het virus. Er is vastgesteld dat ZIKV via de placenta overgedragen kan worden en afwijkingen bij de foetus kan veroorzaken. Door introductie van het (pr)M en het gemuteerde E kan niet uitgesloten worden dat gg-MeV via de placenta de foetus kan infecteren. Omdat de vaccinstam Schwarz waarvan Zika RSP is afgeleid meerdere mutaties bevat die ervoor zorgen dat het virus verzwakt is, acht de COGEM de kans zeer klein dat er risico's zijn voor de foetus. Daarnaast is de vaccinatie tegen mazelen onderdeel van het Rijksvaccinatieprogramma en zijn de meeste mensen ingeënt tegen MeV. Hierdoor is de meerderheid van de bevolking beschermd tegen een infectie met MeV.

De aanvrager geeft aan dat in het E eiwit dat afkomstig is van ZIKV een mutatie geïntroduceerd is. Deze mutatie is gebaseerd op een studie met het E eiwit van het *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV) die net als ZIKV tot het genus *Flavivirus* behoort. Het E eiwit van TBEV verloor door deze mutatie zijn fusie-activiteit, met attenuatie van TBEV tot gevolg.³⁵ De aanvrager verwacht dat de mutatie in het E eiwit van ZIKV in Zika RSP eenzelfde effect zal hebben. De COGEM acht het waarschijnlijk dat de mutatie van E in het ZIKV een verminderde fusie-activiteit zal laten zien, maar kan op basis van één studie een ander effect niet uitsluiten.

Daarnaast kan ze niet uitsluiten dat de E en (pr)M eiwitten worden opgenomen in het membraan van gg-MeV. Verder is het onbekend of Zika RSP zowel het tropisme van het MeV als van het ZIKV verenigd. In dierproeven met MeV waarin oppervlakte-eiwitten van *Human immunodeficiency virus* waren opgenomen, is geen verhoogde virulentie waargenomen.^{36,37}

Omdat MeV een breed gastheerbereik heeft verwacht de COGEM dat het tropisme van Zika RSP niet of nauwelijks zal veranderen. Daarom is zij van mening dat het Zika RSP niet pathogener zal zijn dan het wild-type MeV.

7. Advies

Op basis van de bovenstaande overwegingen, adviseert de COGEM om de werkzaamheden met beide gg-MeVs op ML-II inperkingsniveau in te schalen. Daarbij kan zij instemmen met de in de aanvraag voorgestelde aanvullende voorschriften:

- Het dragen van handschoenen tot over de mouw van de werkkleding is verplicht;
- Open handelingen dienen in een veiligheidskabinet van klasse-II uitgevoerd te worden.

Indien de voorgenoemde werkzaamheden op het geadviseerde inperkingsniveau en onder navolging van de genoemde aanvullende voorschriften worden uitgevoerd, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

8. Punt van overweging voor vergunningaanvrager

Bij de werkzaamheden met gg-MeV varianten acht de COGEM de kans zeer klein dat de medewerkers met de ggo's geïnfecteerd kunnen worden als deze worden uitgevoerd op het geadviseerde inperkingsniveau. Daarbij acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat een infectie als gevolg van een accident consequenties heeft voor gevaccineerde medewerkers. Zij wijst er echter op dat het E en (pr)M van ZIKV betrokken zijn bij de binding van het virus aan de cel, waardoor bij een infectie van een onverhoopt niet gevaccineerde medewerker met Zika RSP de gevolgen voor het ongeboren kind zeer groot kunnen zijn. De COGEM wil de aanvrager daarom in overweging geven om vrouwelijke medewerkers met een kinderwens hier over in te lichten en hen nadrukkelijk zelf de keuze te laten of zij werkzaamheden met deze gg-virussen willen uitvoeren.

9. Referenties

1. Griffin DE (2013). Measles virus. In: Fields virology, 6th edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
2. World Health Organization (2016). Measles fact sheet. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/ (bezoekt: 30 juni 2016)
3. Ornoy A & Tenenbaum . (2006). Pregnancy outcome following infections by coxsackie, echo, measles, mumps, hepatitis, polio and encephalitis viruses. *Reprod. Toxicol.* 21: 446-457
4. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) (2016). Rijksvaccinatieprogramma. www.rijksvaccinatieprogramma.nl (bezoekt: 7 juli 2016)
5. Wang LF *et al.* (2012). Family *Paramyxoviridae*. 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
6. Enders JF & Peebles TC. (1954) Propagation in tissue cultures of cytopathic agents from patients with measles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86: 277-286
7. Schwarz, A. 1962. Preliminary tests of a highly attenuated measles vaccine. *Am. J. Dis. Child.* 103: 216-219
8. De Vries *et al.* (2008). Measles vaccination: new strategies and formulations. *Expert. Rev. Vaccines.* 7: 1215-1223
9. Schwarz A. (1962). Preliminary tests of a highly attenuated measles vaccine. *Am. J. Dis. Child.* 103: 216-219
10. Combredet C *et al.* (2003). A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *J. Virol.* 77: 11546-11554
11. Simmonds P *et al.* (2012). Family *Flaviviridae*. 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
12. Ioos S *et al.* (2014). Current *Zika virus* epidemiology and recent epidemics. *Médecine et Maladies Infectieuses* 44: 302-307

13. Duffy MR *et al.* (2009). *Zika virus* outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* 360: 2536-2543
14. Araujo AQ *et al.* (2016). Zika virus-associated neurological disorders: a review. *Brain.* 2016 Jun 29. pii: aww158. [Epub ahead of print]
15. Vorou R (2016). Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. *Int. J. Infect. Dis.* 48: 85-90
16. Nederlands soortenregister. Overzicht van de Nederlandse Biodiversiteit. *Aedes*. www.nederlandsesoorten.nl/linnaeus_ng/app/views/search/nsr_search.php?search=Aedes (bezocht: 1 maart 2016)
17. D'Ortenzio E *et al.* (2016). Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* 374: 2195- 2198
18. Martines RB *et al.* (2016). Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *Lancet.* pii: S0140-6736(16)30883-2. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30883-2. [Epub ahead of print]
19. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) (2016). Zikavirus. www.rivm.nl/Onderwerpen/Z/Zikavirus (bezocht: 5 juli 2016)
20. Kuno G & Chang G-J J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch. Virol.* 152: 687-696
21. Faye O *et al.* (2013). Quantitative real-time PCR detection of *Zika virus* and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virol. J.* 10: 311-319
22. Baronti C *et al.* (2014). Complete coding sequence of *Zika virus* from a French Polynesia outbreak in 2013. *Genome Announcements* 2: e00500-14
23. Berthet N *et al.* (2014). Molecular characterization of three zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the Central African Republic. *Vector-borne Zoonotic Dis.* 14: 862-865
24. Pierson TC & Diamond MS (2013). Flaviviruses. In: *Fields virology*, volume 1, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
25. Bredenbeek PJ *et al.* (2003). A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *J. Gen. Virol.* 84: 1261-1268
26. Hamel R *et al.* (2015). Biology of *Zika virus* infection in human skin cells. *J. Virol.* 89: 8880-8896
27. Buckley A & Gould EA (1988). Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with *Zika* or *Langat virus*. *J. Gen. Virol.* 69: 1913-1920
28. COGEM (2012). Productie van gg-Measles virus met heterologe oppervlakte-eiwitten. COGEM advies CGM/121206-01
29. COGEM (2014). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/141218-02
30. COGEM (2016). Classificatie van en inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Zika virus*. COGEM advies CGM/160307-01
31. Bankamp B *et al.* (2011). Genetic characterization of measles vaccine strains. *J. Infect. Dis.* 204 Suppl 1: S533-548
32. Desprès *et al.* (2005). Live measles vaccine expressing the secreted form of the West Nile virus envelope glycoprotein protects against West Nile virus encephalitis. *J. Infect. Dis.* 191: 207-214

33. Brandler S *et al.* (2012). Measles vaccine expressing the secreted form of West Nile virus envelope glycoprotein induces protective immunity in squirrel monkeys, a new model of West Nile virus infection. *J. Infect. Dis.* 206: 212-219
34. Brandler S *et al.* (2010). Pediatric measles vaccine expressing a dengue tetravalent antigen elicits neutralizing antibodies against all four dengue viruses. *Vaccine.* 28: 6730-6739
35. Allison SL *et al.* (2001). Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *J. Virol.* 75: 4268-4275
36. Stebbings R *et al.* (2012). Immunogenicity of a recombinant measles-HIV-1 clade B candidate vaccine. *PLoS One* 7: e50397. doi: 10.1371/journal.pone.0050397. Epub 2012 Nov 30
37. Lorin C *et al.* (2004). A single injection of recombinant measles virus vaccines expressing human immunodeficiency virus (HIV) type 1 clade B envelope glycoproteins induces neutralizing antibodies and cellular immune responses to HIV. *J. Virol.* 78: 146-157