

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 02 december 2020
KENMERK CGM/201202-03
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden met gg-NDV

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,


Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 18-045_2.8-002 getiteld 'Inschaling van lentogene Newcastle disease virus (NDV) vaccin stammen', ingediend door Intervet International B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de wijziging van een vergunning betreffende de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) virusvaccins gebaseerd op laagpathogene Newcastle disease virussen (NDV). De aanvrager wil 3 verschillende soorten van genetische modificaties aanbrengen in gg-NDVs die bij een eerdere aanvraag vergund zijn. Het betreft het uitwisseling van niet-structurele of niet-coderende genen met die van virulentere stammen, en het aanbrengen van puntmutaties in de F- en HN-genen. De gg-NDVs zullen geproduceerd worden door een externe partij.

De gg-NDVs zullen geen wijzigingen hebben in de klievingsplaats van het F-eiwit, en deze zal dus gelijk blijven aan de klievingsplaats van laagpathogene stammen. Ook wordt door de externe partij de mate van virulentie van de gg-NDVs bepaald met behulp van de ICPI-index, een maat die ook door de OIE gebruikt wordt om onderscheid te maken tussen laag- en hoogpathogene NDV isolaten. De aanvrager zal enkel gg-NDVs gebruiken met een ICPI van lager dan 0,7, waardoor de gg-NDVs als laagpathogeen worden beschouwd.

De COGEM is van oordeel dat onder deze randvoorwaarden, namelijk het behoud van de monobasische (trypsine) klievingsplaats, en een ICPI lager dan 0,7, de gg-NDVs laagpathogeen zullen zijn. Derhalve kan zij instemmen met de voorgenomen werkzaamheden op ML-II en DM-II, mits aan de randvoorwaarden voldaan wordt, en aanvullende maatregelen gehanteerd worden om verspreiding via aerosolen te voorkomen. De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveaus ML-II en DM-II, met inbegrip van de aanvullende voorschriften, de risico's 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.
- Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
DG Milieu en Internationaal

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM lid dr. ir. G.P. Pijlman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inschaling van werkzaamheden met gg-Newcastle disease virus (NDV) n.a.v een wijziging van een eerdere vergunning

COGEM advies CGM/201202-03

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) virusvaccins gebaseerd op laagpathogene (lentogene) Newcastle disease virus (NDV) stammen LaSota, B1, Clone 30, VG-GA, C2 en Ulster. Het betreft een wijziging op een eerdere vergunning (IG 18-045) voor werkzaamheden waarbij de aanvrager in de lentogene vaccinstammen (LaSota, B1, Clone 30, VG-GA, C2 en Ulster) genetische modificaties toe gaat passen, te weten een uitwisseling van de genen V (LaSota, B1, Clone 30, VG-GA, C2 en Ulster) en F in combinatie met HN (Avian paramyxovirus 2-9) van de gg-laagpathogene NDV stammen LaSota, B1, Clone 30, VG-GA, C2 en Ulster, en de expressie van heterologe sequenties, al dan niet in associatie met proefdieren. Deze activiteiten zijn destijds door Bureau GGO vergund onder ML-II en DM-II (met aanvullende voorschriften).

In de onderhavige aanvraag worden drie verschillende typen van genetische modificaties aangebracht aan de reeds vergunde (chimere) gg-NDVs (met uitsluitend lentogene NDVs, i.e., LaSota, B1, Clone 30, VG-GA, C2 en Ulster als backbone): 1) de uitwisseling van genen die coderen voor niet-structurele eiwitten, met die van een velogene NDV stam, 2) de uitwisseling van sequenties van niet-coderende regionen met die van een andere lentogene, mesogene of velogene NDV stam, en 3) het aanbrengen van puntmutaties in de F en HN genen. Deze aanvullende modificaties hebben als doel vaccinvectoren te optimaliseren door een geringe bevordering van de replicatie en/of een verbeterde antigeenexpressie. De aanvrager verzoekt de gewijzigde werkzaamheden op hetzelfde inperkingsniveau te mogen uitvoeren als de reeds vergunde werkzaamheden, te weten ML-II en DM-II (met aanvullende voorschriften).

2. Newcastle disease virus (NDV)

2.1 Newcastle disease

Newcastle disease virus (NDV) (*Avian orthoavulavirus 1*, voorheen Avian paramyxovirus (APMV-1)) is een negatief enkelstrengs RNA virus behorende tot het genus *Orthoavulavirus*, familie *Paramyxoviridae*.¹ Het virus kan 'Newcastle disease', ofwel pseudovogelpest, veroorzaken, een zeer besmettelijke ziekte bij vele soorten vogels, waaronder kippen, fazanten, duiven, papegaaien en valkparkieten. Newcastle disease is wereldwijd één van de belangrijkste pluimveeziektes en staat vermeld op de lijst van meldingsplichtige dierziekten van de Wereldorganisatie voor diergezondheid (OIE).^{2,3,4}

Niet elke soort is even gevoelig voor Newcastle disease; zo zijn kippen vatbaarder voor NDV dan eenden of ganzen. Ook variëren NDV stammen in virulentie en weefsel tropisme.⁴ Op basis van de virulentie van het virus bij geïnfecteerde kippen, worden NDV stammen in verschillende pathotypen onderscheiden.^{4,5} De velogene (virulente) stammen veroorzaken ernstige systemische infecties met hoge

morbiditeit en mortaliteit (beide oplopend tot wel 100%). Virussen die neurotroop velogeen zijn, veroorzaken hoge mortaliteit als gevolg van neurologische symptomen (draainek, verlammingen) en ademhalingsproblemen. Virussen die viscerotroop velogeen zijn, veroorzaken acute dodelijke infecties met onder meer bloederige darmontsteking en groene diarree. Mesogene (mild-virulente) stammen veroorzaken luchtweginfecties, afname in de eiproductie en neurologische verschijnselen en hebben een lage mortaliteit (<10%). Lentogene (niet-virulente) stammen veroorzaken een milde infectie van de luchtwegen (niezen, hoesten) en een geringe afname in eiproductie. Als laatste zijn er ook virussen die asymptomatische infecties veroorzaken, waarbij de virusreproductie hoofdzakelijk in de darmen plaatsvindt.^{4,5,6}

NDV wordt overgedragen door direct contact met geïnfecteerde vogels, of indirect via contact met besmet voer, uitwerpselen, water of kleding. Daarnaast is NDV ook door de lucht overdraagbaar via aerosolen.^{4,5} Vooral in mest kan het virus een lange tijd infectieus blijven.⁴ Wereldwijd wordt pluimvee gevaccineerd tegen NDV met vaccinstammen afgeleid van lentogene virusstammen.¹³

Mensen kunnen in potentie geïnfecteerd raken met NDV, zowel door virulente stammen alsook door niet-virulente vaccinstammen.⁹ Dergelijke infecties zijn zelflimiterend en leiden niet tot ernstige ziekte.⁹ Er zijn enkele sporadische gevallen van conjunctivitis bij mensen gerapporteerd.⁷ Er is onder andere een uitbraak van NDV in een pluimveebedrijf beschreven, waarbij 40 personen geïnfecteerd raakten en kortdurende conjunctivitis ontwikkelden (3-4 dagen) zonder systemische symptomen.⁸ Mens-op-mens transmissie is nog nooit gerapporteerd.⁹ NDV kan efficiënter repliceren in humane kankercellen dan in normale humane cellen.^{10,15} Een mogelijke verklaring hiervoor is dat er in normale cellen een interferonrespons opgang komt na infectie met NDV, terwijl interferon-signaalroutes vaak defectief zijn in kankercellen.¹⁵ NDV wordt om deze reden als oncolytisch agens voor humaan gebruik toegepast.^{10,11,15,21}

2.2 Genomische organisatie van NDV

Het enkelstrengs negatief RNA genoom van NDV is ~15 kb lang en codeert voor zes eiwitten: het nucleocapside (N), fosfoproteïne (P), matrix-eiwit (M), fusie-eiwit (F), haemagglutinine-neuraminidase eiwit (HN) en het 'large' polymerase eiwit (L).^{12,13} Door 'RNA editing' tijdens de transcriptie van het P gen worden twee additionele eiwitten (genaamd V- en W-eiwit) geproduceerd.¹³ Het RNA-afhankelijke RNA-polymerase bestaat uit de P- en L-eiwitten. Het RNA-genoom, ingepakt door het N-eiwit, vormt samen met het RNA-afhankelijke RNA-polymerase, een zogenaamd ribonucleoproteïne (RNP) 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 oppervlakte-glycoproteïnen HN en F bevinden zich in het lipidemembraan en zijn respectievelijk verantwoordelijk voor de binding aan sialzuur (SA) receptoren van de gastheercel, en fusie van de virale envelop met de gastheercel.^{12,13} Sialzuren zijn wijd verspreid aanwezig op het oppervlakte van alle celtypen van gewervelde en sommige 'hogere' ongewervelde dieren.¹⁴ De gehele replicatie-cyclus van NDV vindt plaats in het cytoplasma van de gastheercel.¹⁵

Het F-eiwit is een belangrijke bepalende factor voor NDV virulentie. Voordat nieuwgevormde virusdeeltjes infectieus zijn, moet het precursor F₀-molecuul door proteases van de gastheercel gesplitst

worden in de F₁- en F₂-eiwitten. De F-eiwitten van lentogene NDV stammen bezitten een basisch aminozuur bij de klievingsplaats van het F₀ precursoreiwit, en kunnen enkel door extracellulaire trypsine-achtige proteases die in de luchtweg- of - maagdkanaalcellen van de gastheer aanwezig zijn, worden gesplitst. Virulente NDV stammen hebben meerdere basische aminozuren bij de klievingsplaats van het F₀ precursor eiwit.^{16,17} Deze kunnen door intracellulaire furine proteases die aanwezig zijn in vrijwel alle lichaamcellen, worden gekliefd. Hierdoor kunnen deze NDV stammen in veel verschillende weefsels repliceren en fatale systemische infectie veroorzaken.^{13,15} Uit onderzoek blijkt dat aanpassing van het enkele basische aminozuur op de klievingsplaats van een lentogene stam naar een polybasisch motief, de virulentie doet toenemen.^{12,17,18} Het F-eiwit is echter niet de enige determinant voor virulentie. Ook van het HN-eiwit wordt verondersteld dat het een rol kan spelen bij de virulentie.¹⁹ Zo kan de virulentie van een lentogene stam ook verhoogd worden door substitutie van het HN gen met die van een virulente stam.¹⁸

2. 3 Lentogene NDV stammen LaSota, Clone 30, B1, VG-GA, C2 en Ulster

De aanvrager is voornemens genetisch gemodificeerde (gg-) vectoren gebaseerd op lentogene NDV stammen LaSota, Clone 30, B1, VG-GA, C2 en Ulster te construeren en optimaliseren in het kader van vaccin-ontwikkeling.

De LaSota en B1 (Hitchner B1) stam zijn de meest gebruikte vaccinstammen en worden wereldwijd al decennia lang als levend vaccin ingezet om pluimvee tegen Newcastle disease te beschermen, en kennen een lange historie van veilig gebruik bij pluimvee.^{20,21} Daarnaast vindt onderzoek plaats met gg-NDV stammen, waaronder LaSota en B1, voor toepassing als recombinant virusvaccin om mensen en dieren tegen pathogenen zoals Ebolavirus, ‘Middle East respiratory syndrome’-coronavirus, ‘Severe acute respiratory syndrome’-coronavirus, Human immunodeficiency virus (HIV), vogelgriepvirus en ‘Rift Valley fever’ virus, te beschermen.^{15,21} In verscheidene pre-klinische studies bij niet-humane primaten zijn de veiligheid en werkzaamheid van NDV stammen (waaronder LaSota) als potentiële vectoren voor humane vaccins onderzocht.^{21,22,23,24} In een studie van Bukreyev *et al.* (2005) is een recombinante LaSota vector die het HN eiwit van ‘human parainfluenza virus’ type 3 (HPIV3) tot expressie bracht, geconstrueerd en is attenuatie van het recombinante virus bij niet-humane primaten aangetoond.²⁴ De niet-humane primaten werden intranasaal en intracheaal geïnoculeerd met de recombinante NDV stam LaSota (twee doseringen van 10^{6,5} PFU). Dit werd goed getolereerd, veroorzaakte geen symptomen, en er was sprake van zeer beperkte virusreplicatie in de luchtwegen.²⁴ In een andere studie werd een recombinante NDV stam met het HA eiwit van H5N1, intranasaal en intracheaal toegediend (twee doseringen van 10⁷ PFU) aan niet-humane primaten. Ook in deze studie werd slechts zeer beperkte replicatie waargenomen, met beperkte virus shedding in luchtwegsecreties.²⁵ Deze preklinische studies bij niet-humane primaten wijzen er op dat de geattenueerde op NDV-gebaseerde virusvaccins geschikte kandidaten kunnen zijn voor verdere ontwikkeling als humane vaccin vectoren.^{13,21}

De stammen LaSota en B1 worden veel toegepast als vaccin voor pluimvee, maar kunnen post-vaccinatie respiratoire bijwerkingen geven. Hierdoor zijn in de loop der jaren verschillende alternatieve lentogene NDV stammen ontwikkeld, die een vergelijkbare bescherming kunnen bieden, maar minder

bijwerkingen geven. Zo zijn Clone 30, VG/GA en de C2 stam ontwikkeld als alternatieven om respiratoire bijwerkingen te verminderen na vaccinatie.^{26,27} Clone 30 betreft een geselecteerde kloon van de LaSota ouderstam, en wordt ook al vele jaren wereldwijd als levend vaccin toegepast in de pluimveehouderij en kent een lange historie van veilig gebruik.^{28,29} Deze kloon komt op nucleotide-niveau voor 99,78% overeen met LaSota, en op basis van aminozuursequenties tussen de 98,4% en 100% voor de L-, NP-, P-, M-, F- en HN-eiwitten.³⁰

De Villegas-Glisson/University of Georgia (VG/GA) stam is oorspronkelijk geïsoleerd uit de darmen van gezonde kalkoenen.²⁷ In tegenstelling tot de LaSota stam, die hoofdzakelijk replicateert in de luchtwegen van kippen, heeft de VG/GA stam een voorkeur voor replicatie in de darmen, en blijft de VG/GA stam minder lang aanwezig in de luchtwegen.²⁷

Naast VG/GA is ook de Ulster (ook wel Ulster 2C genoemd) stam afkomstig van het asymptomatische enterische pathotype.³¹ De Ulster stam is geïsoleerd uit de feces van kippen tijdens een NDV uitbraak waarbij geen klinische symptomen werden waargenomen.³² Ulster verschilt van de meeste NDV stammen in de lengte van het HN-eiwit; de Ulster stam heeft een C-terminale extensie waardoor het een HN-precursor eiwit vormt (HN₀) dat ongeveer 45 aminozuren langer is. Om de biologische activiteit te behouden dient HN₀ proteolytisch gekleefd te worden. Deze extensie van het HN₀ met een totale lengte 616 aminozuren wordt alleen aangetroffen in avirulente stammen.^{17,19}

Zoals eerder is aangegeven, kunnen lentogene varianten van NDV onderscheiden worden van virulente stammen door aanwezigheid van een monobasisch aminozuur bij de klievingsplaats van het F₀-eiwit, waardoor het F₀-eiwit enkel door de extracellulaire trypsine-achtige proteases die in de luchtweg- of maagdarmkanaalcellen van de gastheer aanwezig zijn, kan worden gesplitst. Ook kan onderscheid gemaakt worden op basis van een fenotypische analyse in de vorm van een pathogeniteitsindex door klinische symptomen of het overlijden van geïnfecteerde vogels in kaart te brengen. Een veelgebruikte methode betreft de intracerebrale pathogeniteitsindex (ICPI) in eendagskuikens. De Wereldorganisatie voor diergezondheid (OIE) hanteert als definitie van een meldingsplichtig (virulent) NDV isolaat dat deze stam een klievingsplaats bevat met meerdere basische aminozuren in het F₀ eiwit, ofwel een ICPI index in eendagskuikens heeft van 0,7 of hoger.^{33,34} NDV isolaten die slechts één van deze kenmerken vertonen mogen in de EU niet voor vaccinproductie worden gebruikt, ook niet wanneer het geïnactiveerde vaccins betreft. In onderzoek van Orsi *et al.* (2009) is voor de lentogene stammen uit de onderhavige aanvraag de ICPI bepaald en deze ligt voor alle stammen lager dan 0,7 (0,02 tot 0,37 voor LaSota; 0,11 voor Clone 30; 0-0,19 voor B1; 0 voor Ulster; 0,03 voor VG-GA; en 0,04 voor C2).³¹

3. Voorgenomen werkzaamheden

In de onderhavige vergunningaanvraag worden aanvullende genetische modificaties toegepast in reeds vergunde werkzaamheden met gg-NDV stammen. Deze reeds vergunde werkzaamheden betreffen handelingen (al dan niet in associatie met proefdieren) met de gg-laagpathogene NDV stammen LaSota, B1, Clone 30, VG-GA, C2 en Ulster, waarbij de F- en HN-genen uitgewisseld worden met die van APMV-3, -6 of -8 in een Clone 30 'backbone' (hierover heeft de COGEM in 2014 advies uitgebracht)³⁵. De vergunning voor deze werkzaamheden is in het verleden verder uitgebreid door hieraan toe te voegen: de uitwisseling van V (LaSota, B1, Clone 30, VG-GA, C2 en Ulster) en F in combinatie met HN (Avian paramyxovirus 2-9), en de expressie van heterologe sequenties (HA van het *Influenza A*

virus zonder polybasische klievingsplaats, al dan niet met transmembraandomein, VP2 van het *Infectious bursal disease virus*, Ig 'Heavy' en 'Light chains' van zoogdierherkomst, T-cel epitopen van maximaal 20 aminozuren die niet in de membraaneiwitten worden gekloneerd van Canine distemper virus en Canine parvovirus, en marker- en reportergenen die niet coderen voor een schadelijk genproduct).

In de huidige voorgestelde wijziging van de vergunning worden drie typen van genetische modificaties aangebracht aan de reeds vergunde gg-NDV-APMV en recombinante NDV, waarbij uitsluitend lentogene NDVs, i.e., LaSota, B1, Clone 30, VG-GA, C2 en Ulster, gebruikt worden als backbone:

- 1) de uitwisseling van genen die coderen voor niet-structurele eiwitten met die van een velogene NDV stam;
- 2) de uitwisseling van sequenties van niet-coderende regionen met die van een andere lentogene, mesogene of velogene NDV stam;
- 3) het aanbrengen van puntmutaties in de F- en HN-genen. Hierbij wordt door de aanvrager opgemerkt dat er geen modificatie van de 'furin cleavage site' zal plaatsvinden.

De uitgewisselde sequenties betreffen volgens de aanvrager geen schadelijke genproducten en de verschillende modificaties kunnen gecombineerd worden aangebracht in de (chimere) gg-NDVs die ontwikkeld zijn onder de eerdere vergunde werkzaamheden. De aanvrager heeft de aanpassingen en verwachte effecten kort toegelicht in een vertrouwelijk document. Het doel van deze wijzigingen is om de vaccinvector te optimaliseren door de replicatie van de virale vector te bevorderen en/of een verbeterde antigenexpressie te bewerkstelligen in het kader van vaccinontwikkeling voor pluimvee. De gg-NDV virussen zullen worden geproduceerd door een externe partij. Enkel de aangepaste virussen met een vastgestelde ICPI index van <0,7, zullen worden overgedragen aan aanvrager en gebruikt worden in de infectiestudies van onderhavige aanvraag. Ook wordt een nieuwe gastheersoort toegevoegd aan de vergunning: cellijn CLDK (Cutter Laboratories honden niercellen).

De aanvrager is voornemens laboratoriumwerkzaamheden met de gg-NDVs en handelingen in associatie met proefdieren (kippen (*Gallus domesticus*), kalkoenen (*Meleagris gallopavo*), wilde eenden (*Anas platyrhynchos*) en Japanse kwartels (*Coturnix japonica*)), uit te voeren. Onder de laboratoriumwerkzaamheden vallen ook werkzaamheden met cellen en weefsels afkomstig van het dierverblijf. De aanvrager verzoekt de laboratoriumwerkzaamheden op inperkingsniveau ML-II uit te mogen voeren, en voor activiteiten met deze gg-virussen in associatie met dieren verzoekt de aanvrager een inschaling op DM-II; hierbij worden de standaard werkvoorschriften gehanteerd. Voor handelingen met bevruchte eieren op ML-II stelt de aanvrager dat de volgende aanvullende werkvoorschriften gehanteerd zullen worden:

- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- De geïnfecteerde eieren worden in een gesloten vloeistofdichte doos in een stoof bebroed;
- De dozen worden uitsluitend in een veiligheidskabinet van klasse II geopend en bij eventuele breuk van een ei wordt de gesloten doos in zijn geheel geautoclaveerd.

4. Eerdere COGEM adviezen

Aangezien de velogene stammen van NDV een hoge mortaliteit kunnen veroorzaken in pluimvee en dieren het virus kunnen verspreiden terwijl ze nog geen ziekteverschijnselen vertonen, heeft de COGEM het wild-type NDV (APMV-1) ingedeeld als strikt dierpathogeen in pathogeniteitsklasse 3.^{36,37}

In 2002 heeft de COGEM geadviseerd over gg-werkzaamheden met een vaccinstam die afgeleid is van de lentogene NDV stam LaSota (vaccinstam NDV Clone-30).³⁸ In de vaccinstam werden sequenties coderend voor cytokinen (IL-2, IL-12 en IFN- γ) tot expressie gebracht om de immuunrespons bij proefdieren te versterken. In dit advies adviseerde de COGEM de laboratoriumwerkzaamheden met het vaccivirus uit te voeren op ML-II.

In 2014 heeft de COGEM geadviseerd over de eerdere vergunningaanvraag (genoemd onder paragraaf 3) met gg-NDV vaccins afgeleid van de vaccinstam Clone-30.³⁵ Hierbij werden de oppervlakte-eiwitten F en HN van Clone 30 vervangen door die van APMV-3, -6 en -8 (de COGEM heeft APMV 2-9 in 2013 ingedeeld in PG klasse 2³⁹). De COGEM concludeerde dat de gg-NDV's door uitwisseling van oppervlakte-eiwitten met APMV-3, -6 en -8 niet virulenter zijn dan de in klasse 2 ingedeelde APMV-3, -6 en -8. Gezien het feit dat de lentogene vaccinstam NDV Clone-30 een lange geschiedenis van veilig gebruik kent, adviseerde de COGEM de werkzaamheden op ML-II uit te voeren. Aangezien de vaccinstam conjunctivitis kan veroorzaken en zowel de vaccinstam als de APMV's via de aerogene route (aerosolen) overgedragen kunnen worden, achtte de COGEM het noodzakelijk om bij de werkzaamheden een aantal aanvullende voorschriften te hanteren. Voor de werkzaamheden in associatie met proefdieren heeft de COGEM destijds ingestemd met het verzoek tot inschaling op inperkingsniveau DM-III. Daarbij heeft de COGEM geadviseerd enkele aanvullende inperkingsmaatregelen te hanteren wegens de aerogene overdraagbaarheid van het virus.

In 2020 heeft de COGEM geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met gg-NDV-Spike virussen, waarbij 1) het gehele of een gedeelte van het gen coderend voor het S-eiwit van SARS-CoV-2 geïnsereerd is tussen het P- en het M-gen van NDV LaSota of 2) het S-gen is gefuseerd aan één van de genen van NDV LaSota.⁴⁰ Het betreft hier S-eiwitten waarin een mutatie is aangebracht. De recombinante virussen worden met behulp van 'reverse genetics' geproduceerd en vervolgens vermeerderd tot maximaal 100 liter in bioreactoren door infectie van zoogdiercellen. De COGEM concludeerde dat insertie van de mutante S-sequenties van SARS-COV-2 niet zal leiden tot tropismeverandering van de avirulente NDV LaSota uitgangsstam, en dat de inserties waarschijnlijk zullen resulteren in attenuatie van de gg-virussen. De COGEM stemde in met het uitvoeren van de voorgenomen werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau, in combinatie met de voorgestelde aanvullende maatregelen om verspreiding van aerosolen te voorkomen (het uitvoeren van open handelingen in een veiligheidskabinet klasse 2 (VK-2); het dragen van handschoenen tot over de mouw van de werkkleding; het tegengaan van verspreiding van aerosolen tijdens analyse in FACS-apparatuur).

5. Overweging en advies

In de onderhavige vergunningaanvraag worden aanvullende genetische modificaties toegepast in reeds vergunde werkzaamheden met (chimere) gg-NDV stammen, met als doel de vaccinvectoren te optimaliseren door de replicatie te bevorderen en/of een verbeterde antigen expressie te bewerkstelligen. De aanpassingen hebben volgens de aanvrager geen effect op het gastheertropisme, aangezien de

aangebrachte sequenties afkomstig zijn van een NDV stam met een zelfde gastheerspecificiteit als de vaccinvector.

De aanvrager zal de aanvullende genetische modificaties toepassen in eerder vergunde gg-NDVs gebaseerd op de lentogene NDV stammen B1, LaSota, Clone 30, Ulster, VG-GA en C2. De aanvrager stelt dat in de onderhavige wijziging van de vergunning bij de voorgenomen genetische modificaties geen wijzigingen in de 'furin cleavage site' in het F-eiwit aangebracht worden. De COGEM merkt op dat de monobasische klievingsplaats bij lentogene stammen door trypsine-achtige proteases wordt gekleefd, en bij virulente stammen met een polybasische klievingsplaats door furines. Derhalve bezitten lentogene stammen geen 'furin cleavage site', en gaat de COGEM ervan uit dat de aanvrager hiermee doelt op het behoud van de monobasische klievingsplaats van de lentogene stammen waarvan de vaccins afgeleid zijn. De klievingsplaats van het F-eiwit speelt een belangrijke rol bij virulentie, en aanpassing van het enkele naar een polybasisch motief zorgt voor een verhoging van de virulentie.^{12,17,18} De COGEM acht derhalve dat voor omlaagschaling van de voorgenomen werkzaamheden het noodzakelijk is dat het monobasische motief van de lentogene 'backbone' behouden blijft in de gg-NDVs.

Ook geeft de aanvrager aan dat de productie van deze nieuwe gg-NDVs plaats zal vinden door een externe partij. Enkel wanneer de ICPI index voor deze nieuwe gg-NDV stammen bepaald is en lager is gebleken dan 0,7, zullen deze gg-NDVs overgedragen worden naar de aanvrager. De COGEM is van oordeel dat de ICPI, wanneer uitgevoerd zoals beschreven in OIE Terrestrial Manual Chapter 3.3.14, B1.4.1 (diagnostische technieken), geldt als internationaal geaccepteerde test om onderscheid te maken in virulentie tussen verschillende (natuurlijke) NDV isolaten. Hierbij merkt de COGEM op dat bepaling van de ICPI in afwezigheid van kennis over de klievingsplaats van de NDV stam, alleen niet voldoende is om in te stemmen met de omlaagschaling. NDV stammen waarvan een ICPI van <0,7 bepaald is, maar in het bezit zijn van een polybasische klievingsplaats kunnen na herhaalde (dier)passages reverteren naar een virulentere variant of pathogeen zijn voor andere diersoorten dan de kip.⁴¹

Laboratoriumwerkzaamheden met gg-NDV in cellen en weefsels afkomstig van proefdieren

Bovenstaande in overweging nemende, stemt de COGEM in met de inschaling van de voorgenomen laboratoriumwerkzaamheden op ML-II, mits de monobasische (trypsine) klievingsplaats in de gg-NDV varianten behouden blijft, en de ICPI lager is dan 0,7 (uitgevoerd conform de richtlijnen van de OIE).

Aangezien de NDV vaccinstammen via aerosolen overgedragen kunnen worden, bij mensen in zeldzame gevallen tijdelijke conjunctivitis kunnen veroorzaken, en om verspreiding van de gg-virussen te voorkomen, acht de COGEM het noodzakelijk dat bij de werkzaamheden (conform 9.1.1.3.3.9 van de Regeling ggo) de volgende aanvullende voorschriften worden gehanteerd:

- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd.

Als aanvulling op deze voorschriften adviseert de COGEM voor werkzaamheden met geïnfecteerde eieren:

- De geïnfecteerde eieren worden in een gesloten vloeistofdichte doos in een stoof bebroed;

- De dozen worden uitsluitend in een veiligheidskabinet van klasse II geopend en bij eventuele breuk van een ei wordt de gesloten doos in zijn geheel geautoclaveerd.

Werkzaamheden met gg-NDV in associatie met proefdieren

Eender aan de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden, stemt de COGEM in met een inschaling van de werkzaamheden met gg-NDV in associatie met dieren op DM-II, mits de monobasische (trypsine) klievingsplaats in de gg-NDV varianten behouden blijft, de ICPI lager is dan 0,7 (uitgevoerd conform de richtlijnen van de OIE), en waarbij voor de voorgenomen activiteiten met vogels als aanvullend voorschrift (conform 9.1.6.2.3.7. van de Regeling ggo) geldt:

- De huisvesting van en alle handelingen met de dieren vinden plaats in een onderdrukisolator die voorzien is van een HEPA-filter dat gelijktijdig met de isolator kan worden gedesinfecteerd.

Wanneer er geen gebruik gemaakt kan worden van een onderdrukisolator met HEPA filter, adviseert de COGEM een inschaling op DM-III, met inbegrip van de volgende aanvullende voorschriften:

- het dragen van handschoenen, een mond- en neuskapje (P2 of hogere specificatie) en een beschermende bril is verplicht;
- In de werkruimte moet ander schoeisel worden gedragen. Dit schoeisel wordt na afloop van de werkzaamheden in de werkruimte achtergelaten.

Conclusie

De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveaus ML-II en DM-II, met inbegrip van de bovengenoemde randvoorwaarden en aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 26 november 2020)
2. World Organisation for Animal Health (OIE). OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2020. <https://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/> (bezoekt: 5 juni 2020)
3. Alexander DJ *et al.* (2012). The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathol.* 41: 329–335.
4. OIE-World Organisation for Animal Health. <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/Newcastle-disease/> (bezoekt: 26 november 2020)
5. Wageningen University & Research (WUR). Newcastle disease (pseudovogelpest). <https://www.wur.nl/nl/Onderzoek-Resultaten/Onderzoeksinstituten/Bioveterinary-Research/Dierziekten/Virusziekten/Newcastle-disease-3.htm> (bezoekt: 26 november 2020)
6. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Chapter 1: Newcastle disease virology and epidemiology. <http://www.fao.org/3/y5162e/y5162e02.htm> (bezoekt: 26 november 2020)
7. Lippmann O (1952). Human conjunctivitis due to the Newcastle-disease virus of fowls. *Am. J. Ophthalmol.* 35: 1021-1028

8. Nelson CB *et al.* (1952). An outbreak of conjunctivitis due to Newcastle disease virus (NDV) occurring in poultry workers. *Am. J. Public Health Nations Health* 42: 672-678
9. Alexander DJ (2000). Newcastle disease and other avian paramyxovirus. *Rev. Sci. Tech.* 19: 443-462
10. National Cancer Institute. Newcastle Disease Virus (PDQ®)–Health Professional Version. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/cam/hp/ndv-pdq> (bezocht: 26 november 2020)
11. Freeman AI *et al.* (2006). Phase I/II trial of intravenous ndv-huj oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol. Ther.* 13: 221-228
12. Peeters BP *et al.* (1999). Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: Evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. Virol.* 73: 5001-5009
13. Ganar K *et al.* (2014). Newcastle disease virus: current status and our understanding. *Virus Res.* 184: 71-81
14. Varki A (2008). Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med.* 14: 351–360.
15. Bello MB *et al.* (2020). Exploring the prospects of engineered Newcastle disease virus in modern vaccinology. *Viruses* 12: 451
16. Kim SH *et al.* (2012). Replication, Neurotropism, and Pathogenicity of Avian Paramyxovirus Serotypes 1–9 in Chickens and Ducks. *PLoS ONE* 7: e34927
17. Römer-Oberdörfer A *et al.* (2003). Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. *J. Gen. Virol.* 84: 3121-3129
18. Römer-Oberdörfer A *et al.* (2006). Enhancement of Pathogenicity of Newcastle Disease Virus by Alteration of Specific Amino Acid Residues in the Surface Glycoproteins F and HN. *Avian Diseases* 50: 259-263
19. Yuan P *et al.* (2012). Structure of the Ulster Strain Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Reveals Auto-Inhibitory Interactions Associated with Low Virulence. *PLoS Pathog.* 8: e1002855
20. Goldhaft TM (1980). Historical note on the origin of the LaSota strain of Newcastle disease virus. 24: 297-301
21. Kim SH & Samal SK (2016). Newcastle disease virus as a vaccine vector for development of human and veterinary vaccines. *Viruses* 8: 183
22. DiNapoli JM (2007). Newcastle disease virus, a host range-restricted virus, as a vaccine vector for intranasal immunization against emerging pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 9788–9793.
23. Bukreyev A *et al.* (2007). Successful topical respiratory tract immunization of primates against Ebola virus. *J. Virol.* 81: 6379–6388.
24. Bukreyev A *et al.* (2005). Recombinant Newcastle disease virus expressing a foreign viral antigen is attenuated and highly immunogenic in primates. *J. Virol.* 79: 13275-133
25. DiNapoli, JM *et al.* (2007). Immunization of primates with a Newcastle disease virus-vectored vaccine via the respiratory tract induces a high titer of serum neutralizing antibodies against highly pathogenic avian influenza virus. *J. Virol.* 81: 11560–11568
26. Gelb J *et al.* (2007). valuating Viral Interference Between Infectious Bronchitis Virus and Newcastle Disease Virus Vaccine Strains Using Quantitative Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction. *Avian Diseases* 51: 924-934

27. Perozo F *et al.* (2009). The VG/GA strain of Newcastle disease virus: mucosal immunity, protection against lethal challenge and molecular analysis. *Avian Pathology* 37: 237-245
28. De Boer GF *et al.* (1994). Interaction between chicken anaemia virus and live Newcastle disease vaccine. *Avian Pathol.* 23(2):263-75
29. Voeten AC *et al.* (1987). Comparison of the effect of live Newcastle disease vaccine Clone 30 in broilers administered at day 1 or at day 7 and the effect of H120 vaccination at 17 days of age: A field experiment. *Veterinary Quarterly* 9: 38-48
30. Römer-Oberdörfer A *et al.* (1999). Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J. Gen. Vir.* 80: 2987-2995
31. Orsi MA *et al.* (2009). Newcastle disease virus vaccine strains: immunogenicity is not influenced by ICPI. *Brazilian Journal of Poultry Science* 11: 129-133
32. McFerran JB & Nelson R (1971). Some properties of an avirulent Newcastle disease virus. *Archiv für die gesamte virusforschung* 34: 64-75
33. Wereldorganisatie voor diergezondheid (OIE 2018). Chapter 3.3.14, Newcastle disease (infection with Newcastle disease virus). *OIE Terrestrial Manual*, 964-983
34. Wereldorganisatie voor diergezondheid (OIE 2019). Chapter 10.9, Infection with Newcastle disease virus. *Terrestrial Animal Health Code* 28/06/2019
35. COGEM (2014). Uitwisseling van de oppervlakte eiwitten F en HN tussen aviaire Paramyxovirussen. *COGEM advies* CGM/140404-01
36. COGEM (2006). Classificatie van dierpathogene virussen. *COGEM advies* CGM/060420-04
37. COGEM (2019). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen (2019). *COGEM advies* CGM/190905-02
38. COGEM (2002). Genetische modificatie van enkel-strengs RNA virussen met behulp van infectieuze cDNA methodieken. *COGEM advies* CGM/140404-01
39. COGEM (2013). Classificatie van humaan- en dierpathogene RNA virussen. *COGEM advies* CGM/131031-02
40. COGEM (2020). Inschaling van werkzaamheden met een recombinant Newcastle disease virus met spike van SARS-CoV-2. *COGEM advies* CGM/200605-01
41. Meulemans G *et al.* (2010). Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. *Avian Pathology*, 31: 515-519