

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 04 april 2024
KENMERK CGM/240404-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie van DENV-2 PDK-53

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een verzoek van de Universiteit Utrecht om de pathogeniteitsklasse van het Dengue virus PDK-53 te bepalen (IG 24-033_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van een vaccinstam van het Denguevirus, DENV-2 PDK-53. Het Denguevirus wordt via muggen overdragen naar de mens en is de veroorzaker van knokkelkoorts. Hoewel het merendeel van de infecties zonder ziekteverschijnselen verloopt, kan in sommige gevallen ook levensbedreigende hemorragische koorts of dengue shock syndroom optreden. Het virus is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.

De vaccinstam PDK-53 is verkregen door een denguevirus (DENV-2) 53 keer te passeren op een cellijn afkomstig van de nieren van een hond ('primary dog kidney', PDK). De stam is verzwakt ten opzichte van het oudervirus. Deze stam vormt kleinere plaques in celculturen, is niet pathogeen in muizen en veroorzaakt minder viremie in apen. Dit is voornamelijk toe te schrijven aan 3 mutaties in het virale genoom. Van één mutatie is bekend dat deze relatief makkelijk terugmuteert. Bij een andere mutatie is in zeldzame gevallen reversie opgetreden in deelnemers aan klinische studies. Om de karakteristieken van wildtype Denguevirus te verkrijgen, dienen minstens twee reverterende mutaties op te treden. Terugmutatie van deze beide mutaties is niet waargenomen in de klinische studies.

Bovenstaande in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat DENV-2 PDK-53 verzwakt is ten opzichte van het wildtype Dengue virus. De COGEM adviseert derhalve DENV-2 PDK-53 in te delen in pathogeniteitsklasse 2. Wel adviseert zij om bij experimenten met meerdere passages te controleren op de stabiliteit van de mutaties. Om deze reden adviseert de COGEM deze stam niet op te nemen op Bijlage 4, lijst 4.1 van de Regeling ggo. Daarnaast signaleert zij dat onbedoelde infectie van een medewerker een grotere kans geeft op een ernstiger ziekteverloop bij een opvolgende infectie.



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. Y de Keulenaar, 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. C.A.M. de Haan niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Pathogeniteitsclassificatie van de Dengue virus stam DENV-2 PDK-53

COGEM advies CGM/240404-01

1. Inleiding

In verband met een verzoek van de Universiteit Utrecht (IG 24-033), is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de Dengue virus (DENV) vaccinstam PDK-53, voor plaatsing op lijst 4.1 van Bijlage 4 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo).¹ Deze bijlage bestaat uit lijsten van micro-organismen die pathogeen zijn voor mens, dier of plant. Lijst 4.1 betreft de indeling in klassen van pathogene virussen.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie van een micro-organisme de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden de micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in *pathogeniteitsklasse 1*. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

- a) het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant;
- b) het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
- c) het micro-organisme behoort tot een soort die vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie;
- d) van het micro-organisme is het niet-virulente karakter door middel van adequate tests aangetoond.

Een indeling in *pathogeniteitsklasse 2* is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken.

Een indeling in *pathogeniteitsklasse 3* is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Een indeling in *pathogeniteitsklasse 4* is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

3. Het Dengue virus (DENV)

DENV (species *Orthoflavivirus denguei*, genus *Orthoflavivirus*, familie *Flaviviridae*)² is een arbovirus en kan via geïnfecteerde *Aedes* muggen – in het bijzonder *Ae. aegypti* (gelekoortsmug) of *Ae. albopictus* (Aziatische tijgermug) – overgedragen worden naar de mens.³ Er zijn vier serotypen DENV (serotype 1, 2, 3 en 4) die alle vier onder dezelfde soort worden geschaard.⁴ De voornaamste route van infectie verloopt via muggenbeten. DENV kan echter ook tijdens de zwangerschap van moeder op kind worden overgedragen. In zeldzame gevallen vindt overdracht plaats via bloedproducten of tijdens orgaandonatie.⁵

Het merendeel van de infecties met DENV verloopt zonder ziekteverschijnselen. Echter, het virus kan ook ‘dengue fever’ (knokkelkoorts) veroorzaken. Een klein deel van de infecties leidt daarnaast tot levensbedreigende ziekte zoals hemorragische koorts (‘dengue hemorrhagic fever’ (DHF)) of ‘dengue shock syndroom’ (DSS).⁶ Bijna de halve wereldbevolking leeft in gebieden met een risico op een dengue-infectie, zoals Afrika, Zuidoost-Azië, Centraal- en Zuid-Amerika en het Caribisch gebied.^{3,6} Geschat wordt dat er 100 tot 400 miljoen DENV-infecties per jaar optreden.⁵ Een eerdere infectie met DENV geeft een verhoogd risico op het ontstaan van ernstige klachten bij een daarop volgende infectie met een ander DENV serotype. Dit verschijnsel, waarbij al aanwezige antilichamen tegen DENV een kruisreactie opwekken tegen het nieuwe serotype en daarmee de opname van DENV in de cel vergroten, wordt ‘antibody-dependent enhancement’ (ADE) genoemd.⁷

DENV heeft een positief enkelstrengs RNA-genoom van circa 11 kb, dat is omhuld door een lipidemembraan.^{8,9} Replicatie van het virusgenoom vindt plaats in het cytoplasma van de gastheercel. Het RNA codeert voor één enkel polyproteïne, waarbij het open leesraam (‘open reading frame’, ORF) aan weerszijden wordt geflankeerd door een ‘untranslated region’ (UTR).^{9,10} Door splitsing van het polyproteïne worden verschillende structurele eiwitten (C, (pr)M en E) en zeven niet-structurele eiwitten (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B en NS5) gevormd.^{4,8,9} Het nucleocapside (C) omhult het RNA. De structurele eiwitten (pr)M en E zijn envelopeiwitten, die zich in de lipidemembraan om de nucleocapside bevinden. (pr)M en E zijn betrokken bij de binding van het virus aan de cellulaire receptor, de fusie van het virale membraan (de ‘envelop’) met het membraan van de gastheercel, en de immuniteit tegen het virus.⁸ De NS-eiwitten hebben verschillende functies en zijn onder andere betrokken bij RNA-replicatie en de verwerking van het polyproteïne.^{4,8,9,11} De assemblage van nieuwe virusdeeltjes vindt plaats in het endoplasmatisch reticulum (ER) van de gastheercel, waarbij afsnoering (‘budding’) via het ER-membraan optreedt.¹¹

4. Vaccinstam DENV-2 PDK-53

De DENV-2 vaccinstam PDK-53 is ontwikkeld door de Mahidol universiteit in Bangkok, Thailand, door een wildtype DENV-2 stam (16681) 53 keer serieel te passeren in ‘primary dog kidney’ (PDK) cellen.

De PDK-53 stam wordt onder andere gebruikt als backbone om chimere vaccines te construeren voor andere DENV serotypes. Zo is deze stam gebruikt als backbone voor het Takeda tetravalente dengue vaccine, in Europa ook wel bekend als Qdenga, dat in 2022 toegelaten is tot de Europese markt.^{12,13} DENV-2 PDK-53 wordt als geattenuëerd beschouwd op basis van de temperatuurgevoeligheid, de vorming van kleine plaques *in vitro*, verlies van neurovirulentie in ‘suckling mice’ en verminderde incidentie van viremie in apen.^{18,14} Ook is gerapporteerd dat de replicatie van PDK-53 sterk verminderd is in *A. aegypti* muggen.¹⁵ Daarnaast wordt verondersteld dat PDK-53 minder goed in staat is de antivirale response in humane cellijnen te ontwijken, waarschijnlijk vanwege de adaptatie aan hondencellen na herhaalde passages.¹⁶

In DENV-2 PDK-53 zijn ten opzichte van de ouderstam (DENV-2 16681) negen nucleotiden veranderd.^{17,18} Eén mutatie bevindt zich in de 5’ ‘noncoding region’ (NCR), drie mutaties betreffen stille mutaties in de genen die coderen voor E, NS3 en NS5. De overige vijf mutaties zorgen voor aminozuurveranderingen in de genen die coderen voor PrM, NS1, NS2A, NS3 en NS4. De belangrijkste attenuerende mutaties resulteren o.a. in de vorming van kleine plaques *in vitro*. Deze drie mutaties bevinden zich op positie 57 (C57T) in het 5’ noncoding region (NCR-57), in NS1 (G2579A; Gly53 naar Asp; = NS1-53) en in NS3 (A5270T; Glu250 naar Val; = NS3-250).¹⁸

Het PDK-53 vaccinvirus heeft een ‘mixed genotype’: 71% van de gemengde populatie bezit het gemuteerde NS3-250-Val locus, het andere genotype bezit het NS3-250-Glu locus van de ouderstam 16681.^{17,18} NCR-57 en NS1-53 zijn daarnaast de voornaamste mutaties die verantwoordelijk zijn voor de verminderde replicatie in C6/36 cellen (een *Aedes albopictus* cellijn) en de attenuatie (met betrekking tot de neurovirulentie) in muizen.¹⁸ Hierbij wordt een iets groter attenuerend effect toegeschreven aan de NS1-53 mutatie voor zowel de attenuatie in muizen, als de verminderde replicatie in *Ae. aegypti* muggen.^{18,19} Zowel NS1-53 als NS3-250 lijken verantwoordelijk te zijn voor de temperatuur gevoeligheid (d.w.z. $\geq 90\%$ reductie in virustiter bij 38,7 °C).¹⁸ Ook is de veiligheid en immunogeniteit van DENV-2 PDK-53 (en hierop gebaseerde vaccins) in verschillende klinische studies onderzocht.^{o.a.20,21,22} Het vaccin wordt in het algemeen goed getolereerd en zorgt voor de aanmaak van neutraliserende antilichamen.

Om de wildtype karakteristieken van het oudervirus 16681 terug te krijgen zijn minstens twee reverterende mutaties nodig op zowel het NCR-57 en het NS1-53 locus. Om een groter plaque-fenotype te verkrijgen, en mogelijk een hogere virulentie in muizen, is reversie op het NS3-250 locus nodig.¹⁸

Reversie van één van deze drie mutaties is zowel *in vitro* als *in vivo* (i.e., in klinische studies^{22,23}) gerapporteerd. Na 10 sequentiële passages in Vero cellen werd in 10 van de 18 ‘viral lineages’ reversie waargenomen van het NC-57 locus. Hier werd geen reversie van de NS1-53 en NS3-250 loci waargenomen.²⁴ In het EU Risk Management Plan (RMP) dat onderdeel uitmaakt van het ‘European public assessment report’ (EPAR) van het tetravalente Dengue vaccin Qdenga, – waar PDK-53 onderdeel van uitmaakt en is toegepast als backbone waarbij alleen de prM en E genen met die van andere serotypes zijn uitgewisseld) –, staat dat in 65 van de 775 gevaccineerde individuen reversie van het NC-57 locus waargenomen is. Bij 2 individuen werd een gehele of gedeeltelijke reversie van NS1-53 waargenomen. Reversie van zowel NCR-57 als NS1-53 is niet waargenomen in de klinische studies.

Met betrekking tot het NS3-250 locus is geen reversie gerapporteerd. De reversies gingen niet gepaard met ernstigere ziektesymptomen.²⁵

5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft het Dengue virus (*Orthoflavivirus denguei*) ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.²⁶ Zij heeft nog niet eerder geadviseerd over DENV-vaccinstammen. Wel heeft de COGEM uit het genus *Orthoflavivirus* een levend geattenueerde vaccinstam van het Yellow fever virus (*Orthoflavivirus flavi*), YF-17D in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld.

6. Overweging en advies

De DENV-2 PDK-53 vaccinstam is geattenuerd ten opzichte van de DENV-2 ouderstam. Vaccinstam PDK-53 heeft een verminderde virulentie in muizen, verminderde viremie in apen, verminderde replicatie in C6/36 cellen en in *Ae. aegypti* muggen. Ook in klinische studies wordt deze stam in het algemeen goed getolereerd. De stam wordt als basis gebruikt voor het tot de Europese markt toegelaten Dengue vaccin Qdenga.

Hoewel in PDK-53 negen nucleotiden verschillen ten opzichte van de ouderstam, worden er drie belangrijk geacht voor de attenuatie; NS1-53, NCR-57 en NS3-250. Van de NCR-57 mutatie in PDK-53 is bekend dat deze relatief makkelijk terugmuteert. Zo is reversie gerapporteerd na herhaalde passage in Vero cellen en in meer dan 8% van de deelnemers in klinische studies die gevaccineerd werd met het tetravalente Dengue vaccin. Voor de NS1-53 mutatie is geen reversie gerapporteerd na herhaalde passage in Vero cellen, maar in zeldzame gevallen is reversie opgetreden in deelnemers aan klinische studies. Echter, om de wildtype karakteristieken en daarmee een vergelijkbare pathogeniteit als het oudervirus te verkrijgen, dienen minstens twee reverterende mutaties op te treden op zowel de NCR-57 en NS1-53 loci. Reversie van zowel NCR-57 als NS1-53 is niet waargenomen in de klinische studies.

Het is bekend dat PDK-53 heterogeniteit vertoont met betrekking tot de NS3-250 Glu→Val mutatie. Ongeveer 29% van de virale PDK-53 populatie heeft het NS3-250-Glu uit het oudervirus behouden. Hoewel dit geringe invloed kan hebben op de plaque-grootte en mogelijk ook de virulentie in muizen, is de COGEM van oordeel dat dit niet van invloed is voor de pathogeniteitsclassificatie. Dit mede gezien het feit dat de voornaamste impact op de pathogeniteit gerelateerd is aan de NS2-53 en NCR-57 mutaties.

Bovenstaande in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat DENV-2 PDK-53 verzwakt is ten opzichte van het wildtype DENV-2. De COGEM adviseert derhalve DENV-2 PDK-53 in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

De COGEM wijst erop dat reversie van DENV-2 PDK-53 niet geheel uitgesloten kan worden. Daarom adviseert de COGEM om bij *in vivo* en *in vitro* experimenten met deze vaccinstam elke 5 passages te controleren op de stabiliteit van de attenuerende mutaties.

Gezien de noodzaak voor monitoring op reversie adviseert de COGEM om DENV-2 PDK-53 niet op te nemen op Bijlage 4, lijst 4.1 van de Regeling ggo, tenzij hierbij vermeld kan worden dat COGEM voorwaarden verbindt aan het gebruik van deze stam bij experimenten.

7. Signalering, Arbo-gerelateerde risico's

De COGEM wijst erop dat na incidentele blootstelling en infectie van een medewerker met DENV2 PDK-53 er alleen immuniteit tegen DENV-2 opgebouwd zal worden. Dit heeft als gevolg dat bij een eventuele toekomstige infectie met serotypen 1, 3 of 4 in de betreffende medewerker, de kans op 'dengue haemorrhagic fever', of 'dengue shock syndrome' verhoogd wordt door het ADE-mechanisme. Vanuit Arbo-overwegingen kan dit een reden zijn om extra beschermingsmaatregelen te nemen. Daarnaast moeten blootgestelde medewerkers van dit risico op de hoogte gesteld worden, met het oog op eventuele reizen naar gebieden waar Dengue voorkomt.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072> (bezocht op 21 maart 2024)
2. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202203081 (bezocht op 21 maart 2024)
3. Centers for Disease Control and Prevention. About Dengue. <https://www.cdc.gov/dengue/about/index.html>. (bezocht op 21 maart 2024)
4. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Flaviviridae. <https://ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae/orthoflavivirus>. (bezocht op 21 maart 2024)
5. World Health Organisation. Dengue and severe dengue. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (bezocht op 21 maart 2024)
6. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. Dengue. <https://www.rivm.nl/dengue> (bezocht op 21 maart 2024)
7. Sarker A *et al.* (2023). Dengue virus neutralizing antibody: a review of targets, cross-reactivity, and antibody-dependent enhancement. *Front. Immunol.* 14: 1200195
8. Pierson TC & Diamond MS (2013). Ch. 26. Flaviviruses. In: *Fields Virology*. Edited by Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
9. Harapan H *et al.* (2020). Dengue: a minireview. *Viruses* 12: 829
10. Matsuda M *et al.* (2018). High-throughput neutralization assay for multiple flaviviruses based on single-round infectious particles using dengue virus type 1 reporter replicon. *Sci. Rep.* 8: 16624
11. Lindenbach BD *et al.* (2013). Ch. 25. Flaviviridae. In: *Fields Virology*. Edited by Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
12. European Medicines Agency (EMA, 2022). Dengue Tetravalent Vaccine (Live, Attenuated) Takeda - opinion on medicine for use outside EU. <https://www.ema.europa.eu/en/opinion-medicine-use-outside-EU/human/dengue-tetravalent-vaccine-live-attenuated-takeda> (bezocht op 21 maart 2024)
13. European Medicines Agency (EMA, 2022). Qdenga. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/qdenga> (bezocht op 21 maart 2024)
14. Angsubhakorn S *et al.* (1987). Neurovirulence effects of dengue-2 viruses on the rhesus (*Macaca mulatta*) brain and spinal cord. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 18: 52-55

15. Khin MM *et al.* (1994). Infection, dissemination, transmission, and biological attributes of dengue-2 PDK53 candidate vaccine virus after oral infection in *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51: 864-869
16. Goh KCM *et al.* (2016). Molecular determinants of plaque size as an indicator of dengue virus attenuation. *Sci. Rep.* 6: 26100
17. Kinney RM *et al.* (1997). Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology* 230: 300-308
18. Butrapet S *et al.* (2000). Attenuation markers of a candidate Dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK-53), are defined by mutations in the 5' noncoding region and nonstructural proteins 1 and 3. *J. Virol.* 74: 3011-3019
19. Brault AC *et al.* (2011). Replication of the primary dog kidney-53 dengue 2 virus vaccine candidate in *Aedes aegypti* is modulated by a mutation in the 5' untranslated region and amino acid substitutions in nonstructural proteins 1 and 3. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11: 683-689
20. Bhamarapravati NS *et al.* (1987). Immunization with a live attenuated dengue-2-virus candidate vaccine (16681-PDK 53): clinical, immunological and biological responses in adult volunteers. *Bull. W.H.O.* 65:189-195
21. Vaughn DW *et al.* (1996). Testing of a dengue 2 live-attenuated vaccine (strain 16681 PDK 53) in ten American volunteers. *Vaccine* 14: 329-336
22. George SL *et al.* (2015). Safety and immunogenicity of a live attenuated tetravalent dengue vaccine candidate in flavivirus-naive adults: a randomized, double-blinded phase 1 clinical trial. *J. Infect. Dis.* 212: 1032-1041
23. Osorio JE *et al.* (2014). Safety and immunogenicity of a recombinant live attenuated tetravalent dengue vaccine (DENVax) in flavivirus-naive healthy adults in Colombia: a randomised, placebo-controlled, phase 1 study. *Lancet Infect. Dis.* 14: 830-838
24. Butrapet S *et al.* (2006). Determining genetic stabilities of chimeric dengue vaccine candidates based on dengue 2 PDK-53 virus by sequencing and quantitative TaqMAMA. *J. Virol. Meth.* 131: 1-9
25. Takeda Pharmaceutical company (2022). EU Risk Management Plan (RMP) for dengue tetravalent vaccine (live, attenuated). https://www.ema.europa.eu/en/documents/rmp-summary/qdenga-epar-risk-management-plan_en.pdf (bezoekt: 26 maart 2024)
26. COGEM (2023). Actualisatie van de pathogeniciteitsclassificatielijsten met humaan- en dierpathogene DNA- en RNA-virussen (2023). COGEM advies CMG/230929-01