

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

**DATUM** 30 mei 2013  
**KENMERK** CGM/130530-01  
**ONDERWERP** Advies productie van genetisch gemodificeerde Influenza A/HK/1/68 (HKMA20-C) virussen

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijzigingsverzoek van vergunning IG 12-085 getiteld "alternatieve productiemethode van genetisch gemodificeerd Influenzavirus (type A en B)" van Crucell, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Influenza A virus* (FLUAV) dat gebaseerd is op de backbone van een aan muizen aangepaste Influenza A/HongKong/1/68 stam (een H3N2 virus). De aanvrager wil in het kader van vaccinontwikkeling en vaccinproductie gg-virussen produceren met de hemagglutinine-eiwitten van seizoensgebonden influenza A H3N2 virussen. Er is voorgesteld om de werkzaamheden uit te voeren op ML-II niveau.

De COGEM is van mening dat werkzaamheden met gg-*Influenza A virus* op ML-II niveau ingeschaald kunnen worden, als de uitgangsstam sterk verzwakt is. De aanvrager gebruikt een virusstam die na herhaalde vermenigvuldiging in celkweek is aangepast aan de muis. Op basis hiervan beschouwt de aanvrager het virus als verzwakt voor de mens. Hier zijn echter geen experimentele gegevens over aangeleverd.

De COGEM is van mening dat er op dit moment geen overtuigend bewijs is om de Influenza A/HongKong/1/68 virusstam (HKMA20-C) als laagpathogeen te classificeren. Conform de reguliere classificatie van Influenza A virussen in pathogeniteitsklasse 3, adviseert de COGEM de laboratoriumactiviteiten met deze Influenzavirusstam op ML-III niveau in te schalen, met inachtneming van enkele aanvullende voorschriften.

Op bovengenoemde inperkingsniveau en onder navolging van de gestelde voorschriften acht de COGEM de risico's 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. 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

*Met het oog op eventuele belangenverstrengelingen is het COGEM lid prof. dr. R.A.M. Fouchier niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# Productie van genetisch gemodificeerde Influenza A/HK/1/68 (HKMA20-C) virussen

## COGEM advies CGM/130530-01

### Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de productie van genetisch gemodificeerd (gg-) *Influenza A virus* (FLUAV) dat gebaseerd is op de backbone van een aan muizen aangepaste Influenza A/HongKong/1/68 virusstam (HKMA20-C). De aanvrager wil via 'reverse genetics' en cotransfectie H3 hemagglutinine (HA) genoomsegmenten in de Hong Kong stam introduceren. De gg-stammen die hieruit voortkomen, moeten representatief zijn voor circulerende seizoensgebonden influenza A H3N2 virussen.

Het onderzoek vindt plaats in het kader van de ontwikkeling en de productie van Influenza A vaccins gericht tegen deze seizoensgebonden stammen. De aanvrager wil de voorgenomen werkzaamheden op ML-II niveau uitvoeren met inachtneming van enkele aanvullende voorschriften.

### *Influenza A virus*

Het Influenzavirus, in de volksmond beter bekend als het griepvirus, is een RNA virus dat behoort tot de familie *Orthomyxoviridae*. Het virus is onderverdeeld in drie typen, *Influenza A virus* (FLUAV), B (FLUBV) en C (FLUVC). Alleen het FLUAV kan zowel vogels, mensen en andere zoogdieren infecteren.<sup>1,2</sup> Het genoom van het FLUAV bestaat uit acht unieke genoomsegmenten die coderen voor tien eiwitten, waaronder hemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA).<sup>1,2</sup> Beide eiwitten spelen een belangrijke rol bij de gastheerspecificiteit en de aanmaak van antistoffen tegen het virus.<sup>3,4</sup>

Typering van Influenzavirussen vindt plaats op basis van de aanwezige HA en NA subtypen. In totaal zijn er voor het FLUAV 16 verschillende hemagglutinine subtypen (H1 t/m H16) en 9 verschillende neuraminidase subtypen (N1 t/m N9) bekend. Bij vogels komen alle subtypen voor. Bij de mens komen voor zover bekend alleen de H1, H2, H3, H5, H7, H9, N1 en N2 subtypen voor.<sup>5,6,7</sup>

### *Pathogeniteit van FLUAV*

De pathogeniteit van FLUAV wordt door een aantal factoren bepaald. De eiwitten, die bijdragen aan de virulentie, zijn het niet-structurele eiwit NS1, de polymerase eiwitten PA, PB1 en PB2 en de HA en NA eiwitten.<sup>2,4,8,9,10,11,12</sup> Uit onderzoek is gebleken dat één aminozuurverandering in het PB2 eiwit voldoende is om een van oorsprong laagvirulente virusstam virulent te maken.<sup>3,5,8,13</sup> Het HA eiwit heeft een specifieke klievingplaats voor een cellulair protease. Voor de infectiviteit van het virus is het splitsen van het HA eiwit in HA1 en HA2 een belangrijke stap. Het betreffende protease is voornamelijk actief in epitheelcellen van de luchtwegen, waardoor deze cellen vatbaar zijn voor het virus. Een verandering van enkele aminozuren in een serie basische aminozuren in deze klievingplaats zorgt ervoor dat ook andere proteasen, die actief zijn in andere cellen, het HA

eiwit kunnen klieven.<sup>5,8,13</sup> Hierdoor verandert de specificiteit en gastheerbereik van het virus, maar ook de pathogeniteit.<sup>3,5,14</sup> Uit de Influenzavirusuitbraken in het verleden blijkt dat de aanwezigheid van een polybasische klievingplaats in het HA eiwit een belangrijke aanwijzing is voor de pathogeniteit van het virus.<sup>15,16</sup> Dit kenmerk is echter niet aanwezig in de hoogpathogene influenzastam uit 1918, die verantwoordelijk is voor de Spaanse griep.<sup>17,18,19,20</sup>

### ***Influenza Hong Kong***

De gg-Influenza A stam in de onderhavige aanvraag is gebaseerd op de backbone van de Influenza A/HongKong/1/68 virusstam. Dit H3N2 virus werd in 1968 geïsoleerd tijdens een griepuitbraak onder de bevolking van Hong Kong.<sup>21</sup> Het virus ontstond uit een H2N2 stam waarbij antigene shift is opgetreden. Deze H2N2 stam veroorzaakte in 1957 de Aziatische griep.

De uitbraak in Hong Kong begon in de maand juli en bereikte maximale intensiteit na twee weken. In totaal duurde de uitbraak in Hong Kong zes weken, maar het virus verspreidde zich snel naar omliggende landen.<sup>21</sup> Begin augustus 1968 werden grote uitbraken gesignaleerd in Singapore gevolgd door de Filipijnen, Taiwan, Vietnam, Thailand, India en het noordelijk deel van Australië. Eind oktober brak er een epidemie uit in California waarna het virus zich snel over de rest van de Verenigde Staten verspreidde. Het virus bereikte uiteindelijk Europa, Japan, Afrika en Zuid-Amerika in 1969.<sup>22</sup>

In vergelijking met andere pandemieën, zoals de Spaanse griep in 1918, was het sterftecijfer door de Hong Kong griep relatief laag. De symptomen waren vrij mild en de *'case-fatality ratio'* lag onder de 0,5%, waardoor het volgens de Pandemic Severity Index een categorie 2 pandemie was. Naar schatting heeft de uitbraak van de Hong Kong griep wereldwijd aan één miljoen mensen het leven gekost. Afstammelingen van het Hong Kong virus circuleren sindsdien in de humane populatie. Mede om die reden is het H3N2 virus onderdeel van het griepvaccin.<sup>23</sup>

### ***Influenza HKMA20-C***

De aanvrager wil gg-Influenza A virus maken dat gebaseerd is op de backbone van een aan muizen geïmplementeerde Influenza A/HongKong/1/68 virusstam. Deze zogenoemde HKMA20-C stam is geproduceerd door het prototype Influenza A/HongKong/1/68 isolaat meerdere malen te passeren en te propageren op niet-humane heterologe gastheercellen. Het resulterende virus is vervolgens aan de muis aangepast door seriële passage in muizenlongen na intranasale toediening. Na twintig herhalingen is de voor de muis lethale en replicerende HKMA20-C stam ontstaan. Deze virusstam is vervolgens vermeerderd op bevruchte kippeneieren en getitreerd op een Madin-Darby canine kidney cellijn (MDCK).

### ***Constructie van het gg-virus***

De aanvrager wil via *'reverse genetics'* in combinatie met cotransfectie, van nature voorkomende H3 variant sequenties in de HKMA20-C stam introduceren. De aanvraag heeft geen betrekking op het gebruik van de gegenereerde Influenzavirusstam.

De Influenza H3N2 HA segmenten worden volgens de aanvrager verkregen via RT-PCR op RNA van klinische Influenza A virus isolaten, veld -en/of laboratoriumstammen of synthetisch

geproduceerde RNA sequenties. De sequenties worden in antisense orientatie in een plasmide gebracht en vermeerderd in *Escherichia coli*. Vervolgens worden de plasmiden met het HA genoomsegment samen met helperplasmiden in HEK293 cellen getransfecteerd.

De helperplasmiden bevatten de PB1, PB2, PA en NP sequenties (gekloneerd in de sense orientatie) afkomstig van de Influenza A/California/7/09 virusstam. Cotransfectie van de helperplasmiden zal volgens de aanvrager resulteren in vermeerdering van het HA genoomsegment. De volgende stap betreft infectie van de getransfecteerde cellen met de Influenzavirus HKMA20-C stam. Het is de bedoeling dat hieruit viruspartikels ontstaan met het HA genoomsegment van interesse. De sequenties van de helperplasmiden zullen volgens de aanvrager niet worden ingebouwd in de resulterende viruspartikels. Het gewenste virus zal via een 'plaque assay' worden geïsoleerd.

### **Eerder COGEM advies**

In 2004 heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van het FLUAV.<sup>24</sup> De COGEM heeft destijds geadviseerd om alle FLUAV stammen, inclusief de laagpathogene stammen, zowel met aviair als niet-aviair tropisme, in te delen in pathogeniteitsklasse 3, aangezien laagpathogene FLUAV stammen in staat zijn op een relatief eenvoudige manier te evolueren naar hoogpathogene stammen. Bovendien vormen deze virussen een potentieel gezondheidsrisico voor mens én dier, en zijn zij zeer besmettelijk voor verschillende vogelsoorten. Deze classificatie heeft als gevolg dat werkzaamheden met gg-virus minimaal uitgevoerd dienen te worden op ML-III of DM-III niveau, waarbij afhankelijk van het type werkzaamheden aanvullende voorwaarden gesteld kunnen worden zoals adembescherming, vaccinatie en toepassing van antivirale middelen.

In het verleden heeft de COGEM diverse malen geadviseerd over eventuele omlaagschaling van werkzaamheden met gg-FLUAV. Voor bepaalde verzwakte gg-Influenzavirus stammen (rech1N1, rech2N2, rech3N2, rech5N1 en rech7N7) werd omlaagschaling naar ML-II inperkingsniveau mogelijk geacht, mits daarbij aanvullende voorschriften in acht werden genomen.<sup>25,26,27,28,29,30</sup> De recombinanten waren gebaseerd op voor mensen sterk geattenuerde en avirulente virussen die onder meer worden toegepast in vaccins zoals Port Chalmers 1 (PC1), Puerto Rico 8 (PR8) en WSN 33. Voor al deze verzwakte gg-Influenza A stammen gold dat de polybasische klievingplaats in het HA ontbrak.

Samengevat heeft de COGEM gesteld dat er aan drie voorwaarden moet worden voldaan voordat zij adviseert dat laboratoriumwerkzaamheden met gg-FLUAV stammen op ML-II inperkingsniveau ingeschaald kunnen worden.<sup>30</sup> Deze voorwaarden zijn:

- het gg-FLUAV bestaat uit minimaal zes genoomsegmenten afkomstig van een niet-virulente verzwakte laboratoriumstam in combinatie met één of twee genoomsegmenten van andere Influenzavirussen;
- de heterologe gensegmenten zijn volledig gekarakteriseerd;
- voor heterologe HA-coderende gensegmenten geldt dat de aanwezigheid van een polybasische klievingplaats is uitgesloten.

In 2006 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met gg-FLUAV stammen onder ML-III inperking.<sup>27</sup> Zij heeft gesteld dat verspreiding dient te worden tegen gegaan en contact met deze virussen geminimaliseerd dient te worden. Om deze reden heeft zij geadviseerd dat:

- open handelingen plaatsvinden in een klasse-II veiligheidskabinet;
- medewerkers gevaccineerd dienen te zijn;
- medewerkers met griepsymptomen uitgesloten dienen te worden van deelname aan de werkzaamheden;
- het dragen van handschoenen verplicht is;
- bij werkzaamheden met H7 gg-Influenzavirussen een beschermende bril verplicht is;
- het dragen van een mond- en neuskapje (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2) verplicht is;

De COGEM is van mening dat de combinatie van al de hierboven genoemde factoren de kans op verspreiding van gg-FLUAV en de daarmee geassocieerde kans op 'reassortment' (uitwisseling van genomsegmenten tussen wildtype virus en gg-virus) reduceert en daarmee de kans op het optreden van een onbedoelde infectie en vermenigvuldiging van het gg-virus, en de risico's als gevolg hiervan, verwaarloosbaar klein zijn.

### **Overweging en advies**

Laboratoriumhandelingen met gg-Influenza A virussen worden in beginsel op grond van de classificatie van het *Influenza A virus* op ML-III inperkingsniveau ingeschaald. Echter, voor laagpathogene Influenza A virussen of voor geattenueerde virussen kan een lagere inperking worden gehanteerd.

De aanvrager wil gg-Influenza A virussen produceren op basis van de backbone van een aan muizen aangepaste Influenza A/HongKong/1/68 virusstam. In deze virusstam zijn aminozuurveranderingen opgetreden in de PB2, Pa, HA, NP, NA, M en NS eiwitten. Volgens de aanvrager heeft één specifieke mutatie in NS geleid tot een verbeterde replicatie in muizen en zijn de beschreven veranderingen zeer specifiek voor de gastheer. Hij baseert zich hiervoor op enkele publicaties uit de wetenschappelijke literatuur.<sup>31,32</sup>

De aanvrager vermoedt dat de stam vanwege herhaalde vermenigvuldiging is celkweek geattenueerd is voor de mens. Hij levert hier echter geen experimentele gegevens voor aan. De COGEM merkt op dat het uitgangsvirus virus zeer virulent is voor mensen en dat de HKMA20-C stam niet bestudeerd is in fretten. Deze dieren worden algemeen beschouwd als een adequaat proefdiermodel om de mogelijke attenuatie van Influenzavirussen te bestuderen. Verder is de populatie-immuniteit tegen de geconstrueerde recombinante virussen onbekend. De COGEM is daarom van mening dat er op dit moment geen overtuigend bewijs is om de Influenza A/HongKong/1/68 stam HKMA20-C als laagpathogeen te classificeren. De COGEM adviseert daarom de laboratoriumactiviteiten met deze Influenzavirusstam op ML-III niveau in te schalen. Om eventuele risico's verder te beperken adviseert de COGEM daarbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren.

- Open handelingen dienen in een veiligheidskabinet van klasse 2 uitgevoerd te worden.
- Medewerkers dienen gevaccineerd te zijn tegen humaan FLUAV.
- Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden.
- Het dragen van handschoenen is verplicht.
- Medewerkers dienen een mond- en neuskapje (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149) te dragen.

Onder dit inperkingsniveau en onder navolging van de genoemde aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

### Referenties

1. Kawaoka Y *et al.* (2005). The Negative Sense Single Stranded RNA viruses, family *Orthomyxoviridae*. In: Virus taxonomy, eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Edited by Fauquet CM *et al.* Elsevier Academic Press, Amsterdam. 681-687
2. Wright PF and Webster RG (2001). Orthomyxoviruses. In: Fields Virology, volume 1, fourth edition. Edited by Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia. 1533-1579
3. Brown EG (2000). Influenza virus genetics. Biomed Pharmacother 54: 196-209.
4. Zambon MC (2001). The pathogenesis of influenza in humans. Rev Med Virol 11: 227-41.
5. Flint SJ *et al.* (2004). Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis and Control. ASM Press, Washington, D.C.
6. Lewis DB (2006). Avian flu to human influenza. Annu Rev Med 57: 139-154.
7. Belser JA *et al.* (2009). Past, present, and possible future human infection with *Influenza A virus* subtype H7. Review Em Inf Dis 15(6): 859-865.
8. Hatta M *et al.* (2001). Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 *Influenza A viruses*. Science 293: 1840-1842.
9. Webster RG *et al.* (1992). Evolution and ecology of *Influenza A viruses*. Microbiol Rev 56: 152-179.
10. Matrosovich M *et al.* (2000). Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. J Virol 74: 8502-8512.
11. Kobasa D *et al.* (1999). Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the *Influenza A virus* neuraminidase. J Virol 73: 6743-6751.
12. Seo SH *et al.* (2002). Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. Nat Med 8: 950-954.
13. Horimoto T en Kawaoka, Y (2001). Pandemic threat posed by avian *Influenza A viruses*. Clin Microbiol Rev 14: 129-149.
14. Ito T *et al.* (2001). Generation of a highly pathogenic avian *Influenza A virus* from an avirulent field isolate by passaging in chickens. J Virol 75: 4439-4443.
15. Garten W & Klenk HD (1999). Understanding influenza virus pathogenicity. Trends in Microbiology 7(3):99-100.
16. Perdue MI. (2008). Molecular determinants of pathogenicity for avian influenza viruses. In: Avian influenza. Edited by Swayne DE, Blackwell Ames IA, 23-41.

17. Stevens J *et al.* (2004). Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science* 303: 1866-1870.
18. Reid AH *et al.* (1999). Origin and evolution of the 1918 'Spanish' influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1651-1656.
19. Goto H & Kawaoka, Y (1998). A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human Influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10224-10228.
20. Kobasa D *et al.* (2004). Enhanced virulence of *Influenza A viruses* with the hemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature* 431: 703-707.
21. Chang WK (1969). National influenza experience in Hong Kong, 1968. *Bull.Org.mond.Santé, Bull. Wld Hlth Org.* 41: 349-351.
- Cockburn CW *et al.* (1969). Origin and progress of the 1968-69 Hong Kong influenza epidemic. *Bull.Org.mond.Santé, Bull. Wld Hlth Org.* 41: 345-348.
23. Kamps BS. Influenza Report 2006. [www.influenzareport.com](http://www.influenzareport.com).
24. COGEM (2004). Advies Influenza A virus. COGEM advies CGM/040326-03.
25. COGEM (2006). Ontwikkeling van influenza virus m.b.v. een reverse genetics systeem (IG 06-041). COGEM advies CGM/060724-03.
26. COGEM (2006). Handelingen met laag pathogene H5N1 in serologisch onderzoek (IG 06-052). COGEM advies CGM/060724-04.
27. COGEM (2006). Aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met gg-Influenza A virussen. COGEM advies CGM/061214-01.
28. COGEM (2006). Handelingen met recombinant H7N7 in serologisch onderzoek (IG 06-052/01). COGEM advies CGM/061218-01.
29. COGEM (2007). Inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd influenzavirus. COGEM advies CGM/070510-02.
30. COGEM (2010). Inschaling van werkzaamheden met gg-influenza A/Udorn/307/72. COGEM advies CGM/100830-02.
31. Brown EG *et al.* (2001). Pattern of mutation in the genome of influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung: identification of functional themes. *PNAS* 98: 6883-6888.
32. Dankar SK *et al.* (2011). Influenza A virus NS1 gene mutations F103L and M106L increase replication and virulence. *Virology Journal* 8:13.