

Aan de Minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 27 november 2007
KENMERK CGM/071127-01
ONDERWERP Karakterisatie van primatenpolyomavirussen

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag met de titel "Konstruktie van genoomlengte kloon van primaten polyomavirussen voor in vitro analyse van virale replicatie en pathogeniciteit" van de Stichting Biomedical Primate Research Centre te Rijswijk, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van de re-constructie van complete genomen van nieuw ontdekte primatenpolyomavirussen en de productie en karakterisatie van deze virussen. De aanvrager heeft in bloed en weefselmonsters van een aantal apensoorten verschillende nieuwe primatenpolyomavirussen ontdekt. Om inzicht te krijgen in de replicatie en de *in vitro* pathogeniteit van deze nieuw ontdekte virussen wil de aanvrager de genomen van deze primatenpolyomavirussen kloneren en deze gebruiken om de betreffende polyomavirussen te produceren en hun transformerende eigenschappen in kaart te brengen.

Wegens de beperkte pathogeniteit van de reeds beschreven niet-humane primatenpolyomavirussen en het feit dat de nieuwe polyomavirussen niet in verband staan met polyomavirus-gerelateerde ziekteverschijnselen, acht de COGEM het niet waarschijnlijk dat de nieuwe ontdekte primatenpolyomavirussen een hogere pathogeniteit zullen bezitten dan de bekende primatenpolyomavirussen. De COGEM adviseert daarom de nieuwe polyomavirussen ook in te delen in pathogeniteitsklasse 2. Conform deze inschaling is de COGEM van mening dat de voorgestelde kloneringswerkzaamheden op ML-I niveau uitgevoerd dienen te worden. Voor de transductie van animale cellen met de nieuw ontdekte polyomavirussen en voor daarop volgende handelingen met de getransduceerde cellen vindt de COGEM een ML-II inperkingsniveau afdoende. Om mogelijke risico's verder in te perken dienen alle open handelingen in een veiligheidskabinet klasse II uitgevoerd te worden en medewerkers handschoenen te dragen. Onder de gestelde voorwaarden is de COGEM van mening dat de risico's van de werkzaamheden met de nieuw ontdekte, primatenpolyomavirussen 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,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'Z' followed by a horizontal line that ends in a small hook.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Dr. D.C.M. Glandorf
Dr. I. van der Leij

Replicatie en transformatie eigenschappen van nieuwe primaten polyomavirussen

COGEM advies CGM/071127-01

Inleiding

In het kader van een reeds vergund onderzoeksproject (IG 05-124) naar het voorkomen van polyomavirussen bij niet-humane primaten analyseert de aanvrager bloed- en weefselmonsters van niet-humane primaten afkomstig uit het eigen onderzoekscentrum, uit dierentuinen en uit opvangcentra in Indonesië. Met behulp van PCR zijn in deze monsters verscheidene nieuwe polyomavirussen ontdekt. Om de replicatie van deze nieuw ontdekte polyomavirussen te bestuderen en om te achterhalen of ze transformerende eigenschappen hebben, is de aanvrager voornemens de volledige genomen van deze virussen te kloneren. Vervolgens zullen de gekloneerde virale genomen gebruikt worden om de polyomavirussen *in vitro* op te kweken, de replicatie van desbetreffende polyomavirussen te monitoren en de transformerende eigenschappen in kaart te brengen.

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de nieuw ontdekte primatenpolyomavirussen. Tevens is zij verzocht te adviseren over de inschaling van de klonering van de complete virale genomen en de productie en karakterisatie van deze nieuw ontdekte polyomavirussen in animale cellen.

Polyomavirus

De familie van de *Polyomaviridae* bestaat voornamelijk uit primatenpolyomavirussen zoals *African green monkey polyomavirus*, *Baboon polyomavirus*, *Simian virus 12* en *Simian virus 40*. Tevens zijn er twee humane polyomavirussen beschreven, nl: *BK polyomavirus* (BKPyV) en *JC polyomavirus* (JCPyV)(1, 2). Het BKPyV is geïsoleerd uit een patiënt, die een niertransplantatie had ondergaan. Het JCPyV is geïsoleerd uit een patiënt met progressieve multifocale leukoencefalopathie. In beide gevallen hadden de patiënten een beperkt functionerend immuunsysteem (2).

Het genoom van het polyomavirus is een circulair dsDNA molecuul en codeert voor drie structurele eiwitten VP1, VP2 en VP3. Daarnaast brengt het polyomavirus een aantal niet-structurele eiwitten tot expressie waaronder het 'large T antigen' en 'small t antigen'. Voor replicatie heeft het polyomavirus componenten van de gastheer nodig, die betrokken zijn bij DNA-replicatie. Hiervoor zet het 'large T antigen' de cel aan tot celdeling. Bovendien bindt dit virale eiwit aan replicatiefactoren van de gastheer en zorgt het voor de interactie van deze factoren met het virale 'origin' of DNA replicatie. In ontvankelijke cellen vindt dientengevolge een efficiënte replicatie van het virus plaats,

maar een dergelijke productieve infectie is beperkt door het beperkte gastheerbereik van de meeste polyomavirussen. In niet ontvankelijke cellen, waarin het polyomavirus niet kan repliceren, kan het 'large T antigen' echter wel dusdanig ingrijpen in de cel dat deze getransformeerd wordt. De cel raakt het virale DNA normaal gesproken na een paar dagen kwijt, waardoor de transformatie kortstondig is. In uitzonderlijke gevallen kan het virusgenoom echter geïntegreerd worden in het genoom van de gastheer en bestaat de kans dat het virus de cel permanent transformeert.

Naast de humane polyomavirussen BKPyV en JCPyV wordt ook het niet-humane primatenpolyomavirus SV40 in mensen aangetroffen (3). Ze zijn alledrie in staat humane cellen *in vitro* te transformeren en ze kunnen tumoren induceren in verscheidene knaagdieren. Verschillende studies wijzen uit dat een groot deel van de wereldbevolking seropositief is voor BKPyV en/of JCPyV (3, 4).

Transmissie van polyomavirussen kan plaats vinden door de reactivatie van een latente infectie tijdens zwangerschap, door beperkte shedding van het virus via de urine en soms door orgaan transplantatie. Het virus kan ook overgedragen worden door contact en door een 'airborne' infectie (1, 5).

Naast de primatenpolyomavirussen zijn polyomavirussen ook aangetroffen in knaagdieren en vogels. Over het *Aviary polyomavirus* (APV) heeft de COGEM al eerder geadviseerd (6). Dit APV, het zogenaamde *Budgerigar fledging disease virus* (BFDV) is geïsoleerd uit jonge grasparkieten en veroorzaakt bij deze dieren een besmettelijke ziekte met een mortaliteit van 100%. Het APV leidt ook bij andere vogelsoorten zoals hoenderachtigen, papagaaien valken en vinken tot ziekte en mortaliteit. Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat het APV pathogeen is voor de mens en APV is destijds ingedeeld als dierpathogeen in klasse 2.

Overweging en advies

Pathogeniteitsklasse

Tot op heden zijn er acht primaten polyomavirussen beschreven (1), waarvan er drie in verband kunnen worden gebracht met een zekere mate van pathogeniteit in de mens. Het betreft twee humane polyomavirussen, het zogenaamde JCPyV en BKPyV en een PyV uit de rhesus aap, het zogenaamd SV40 virus. Deze pathogeniteit is afhankelijk van de vitaliteit van het immuunsysteem en wordt alleen waargenomen indien het immuunsysteem van de gastheer onderdrukt wordt of slecht functioneert. Deze virussen kunnen *in vitro* humane cellen transformeren. Bovendien induceren ze tumoren in verscheidene diermodellen. Aan de hand van virulentie, verspreidingsvermogen onder de bevolking en behandelingsmogelijkheden worden virussen ingedeeld in verschillende pathogeniteitsklassen. Volgens de Regeling genetisch gemodificeerde organismen wordt

de familie der *Polyomaviridae* inclusief JCPyV, BKPyV en SV40 ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. (7)

De nieuwe primatenpolyomavirussen die de aanvrager heeft ontdekt zijn afkomstig uit aapachtigen uit het eigen onderzoekscentrum, uit dierentuinen en uit opvangcentra. Er is als gevolg van deze virussen geen sprake van polyomavirus-gerelateerde ziekteverschijnselen. Tevens geeft de aanvrager aan dat het genoom van een aantal nieuwe polyomavirussen, waarvan de sequentie reeds is bepaald een grote overeenkomst vertoont met al bekende polyomavirus genomen. De COGEM merkt op dat er geen volledige zekerheid kan bestaan over de pathogeniteit van nieuwe primatenpolyomavirussen. Het onderhavig onderzoek heeft juist tot doel de mogelijke pathogeniteit en transformerende eigenschappen van nieuwe niet-humane primatenpolyomavirussen te bestuderen. Op basis van de eigenschappen van de reeds beschreven niet-humane primatenpolyomavirussen, waarbij alleen SV40 *in vitro* aantoonbare transformerende eigenschappen in humane cellen bezit, acht de COGEM het echter niet waarschijnlijk dat de nieuwe ontdekte polyomavirussen pathogener zullen zijn dan de eerder beschreven polyomavirussen. Daar komt bij dat de betreffende apen door hun gevangenschap regelmatig in contact zullen zijn gekomen met mensen. Aangezien de aanvrager meldt dat er geen polyomavirus-gerelateerde ziekteverschijnselen zijn waargenomen, acht de COGEM de kans klein dat de nieuw ontdekte polyomavirussen voor de mens pathogener blijken te zijn dan de reeds beschreven primaten polyomavirussen. In dit kader ziet de COGEM dan ook geen redenen om de nieuwe primatenpolyomavirussen in andere pathogeniteitsklasse in te delen dan de reeds bekende polyomavirussen en acht een indeling van de nieuwe primatenpolyomavirussen in pathogeniteitsklasse 2 gerechtvaardigd.

Inperkingsniveau en aanvullende voorschriften

Gezien bovenstaande overwegingen en de daaruit voortkomende indeling van de nieuwe niet-humane primatenpolyomavirussen in pathogeniteitsklasse 2, is de COGEM van mening dat het kloneren van de volledige genomen van de nieuwe polyomavirussen uitgevoerd kan worden onder ML-I niveau en de daarvoor geldende werkvoorschriften.

Voor de transfectie van de complete genomen van de nieuwe polyomavirussen in animale cellen, de infectie van animale cellen en daarop volgende handelingen met getransduceerde cellen is de COGEM van mening dat deze werkzaamheden minimaal uitgevoerd dienen te worden op ML-II niveau. Ter voorkoming van een mogelijke transmissie via inademing van infectieuze aerosolen en met het oog op de eventueel aanwezige transformerende eigenschappen van dergelijke polyomavirussen, acht de

COGEM het noodzakelijk een tweetal aanvullende voorschriften te hanteren. Deze voorschriften zijn:

- Open handelingen dienen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet van klasse-II.
- Het dragen van handschoenen is verplicht

Ten aanzien van de analyse van geïnfecteerde cellen merkt de COGEM tevens op dat microscopische analyses in afgesloten containers, zoals een gesloten kweekfles uitgevoerd dienen te worden. De COGEM is bovendien van mening dat een electronmicroscopische analyse (inclusief de monstervoorbereiding) van geïnfecteerd materiaal alleen buiten het ML-II inperkingsniveau uitgevoerd kan worden, indien de mogelijk gecontamineerde cellen met een gevalideerde inactivatie methode behandeld zijn, zodat het materiaal geen infectieus virus meer bevat.

Conclusie

Concluderend is de COGEM van mening dat door de aanvrager ontdekte primatenpolyomavirussen ingedeeld kunnen worden in pathogeniteitsklasse 2. Dientengevolge adviseert zij om de klonering van de complete genomen van bovengenoemde polyomavirussen uit te voeren op ML-I niveau. Daarnaast adviseert de COGEM de voorgenomen productie en werkzaamheden met de nieuw ontdekte polyomavirussen in te schalen op ML-II niveau. Om de risico's voor mens en milieu verder te beperken, acht de COGEM het van belang dat alle open handelingen uit gevoerd worden in een veiligheidskabinet klasse-II en dat de medewerkers tijdens de werkzaamheden handschoenen dragen. Met inachtneming van de gestelde inperkingsmaatregelen en de aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu bij uitvoering van de beschreven proeven verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Van Regenmortel MHV *et al.*(eds) (2000) Virus Taxonomy: 241-246
2. Knippe DM and Howley PM (eds) (2001) Fields Virology: *Polyomaviridae*: The viruses and their replication 2141-2174
3. Moens U *et al.* (2007) Oncogenic potentials of the human polyomavirus regulatory proteins. Cell. Mol. Life Sci. 64:1656-1678
4. Vilchez RA and Kusne S. (2006) Molecular and clinical perspectives of polyomaviruses: emerging evidence of importance in non-kidney transplant populations. Liver Transpl. 12:1457-1463
5. Flint SJ *et al.* (eds) (2004) Principles of virology. 865

6. COGEM (2001). Deleties van het aviaire polyomavirus (APV) als vaccin tegen ziektes veroorzaakt door dit virus (CGM/010413-03).
7. VROM (2004) Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het besluit genetisch gemodificeerde organismen.