

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

DATUM 21 juli 2008
KENMERK CGM/080721-03
ONDERWERP Advies: Inschaling van werkzaamheden met NYVAC-C mutanten

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van de vergunningaanvraag van het Academisch Ziekenhuis Leiden (AZL) en het Biomedical Primate Research Centre (BPRC) betreffende werkzaamheden met verschillende mutanten van het vacciniavirus Copenhagen deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een aantal nieuwe mutanten van het vacciniavirus Copenhagen. Vacciniavirussen worden veelvuldig gebruikt als basis voor vaccins. De aanvragers willen de nieuwe mutanten gebruiken in hun onderzoek naar een vaccin tegen HIV.

Een algemeen gebruikte variant van het vacciniavirus Copenhagen is het zogenaamde NYVAC virus. Deze variant mist 18 genen ten opzichte van het vacciniavirus Copenhagen waardoor een sterk verzwakt virus is ontstaan. Op basis van het bewezen niet-virulente karakter van NYVAC heeft de COGEM in 2003 geadviseerd deze variant omlaag te schalen in pathogeniteitsklasse 1. De vacciniavirusstam Copenhagen is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.

De aanvrager wil onder andere gebruik maken van de mutanten NYVAC-KC-C en NYVAC+12-deltaE3L/ATV_h-C. In deze mutanten zijn een deel van de genen die uit NYVAC zijn verwijderd, teruggeplaatst. Deze genen zijn van invloed op de virulentie en het gastheerbereik van het virus. Op basis van de beschikbare informatie kan de COGEM niet uitsluiten dat de virulentie van deze mutanten in mensen hoger zal zijn dan de virulentie van NYVAC. Zij adviseert derhalve de laboratoriumwerkzaamheden met deze twee mutanten in te schalen op ML-II niveau, gelijk aan werkzaamheden met de vacciniavirusstam Copenhagen. De werkzaamheden met deze mutanten in associatie met dieren dienen op DM-II niveau uitgevoerd te worden.

De aanvrager wil tevens een breed scala aan deletiemutanten van NYVAC gaan gebruiken. De kans dat er door deletie van één of meer genen uit NYVAC een virus ontstaat dat een hogere virulentie bezit dan NYVAC, acht de COGEM verwaarloosbaar klein. Daarom adviseert de COGEM de laboratoriumwerkzaamheden met deze deletiemutanten in te schalen op ML-I niveau. De werkzaamheden met deze deletiemutanten in associatie met dieren dienen naar de mening van de COGEM op DM-I niveau uitgevoerd te worden.

Onder bovengenoemde inperkingsniveaus en de daarbij behorende voorschriften is de COGEM van mening dat de veiligheid voor mens en milieu afdoende is gewaarborgd.

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
Dr. I. van der Leij

Inschaling van werkzaamheden met NYVAC-C mutanten

COGEM advies CGM/080721-03

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met verschillende NYVAC mutanten. NYVAC is een afgeleide van de vacciniavirusstam Copenhagen, waaruit 18 verschillende gensequenties zijn verwijderd (1). Dit resulteert in een sterk geattenuëerd virus, dat door de aanvragers wordt gebruikt voor de ontwikkeling van een vaccin tegen HIV. Voor het opwekken van een afweerreactie tegen HIV is een deel van het HIV-1 genoom in NYVAC gezet. De vector die hierdoor ontstaat wordt aangeduid met de naam NYVAC-C (2).

Om de invloed van het virusgenoom op de afweerreactie tegen HIV te onderzoeken zijn de aanvragers van plan om drie verschillende NYVAC-C mutanten te testen.

1. Het eerste geval betreft de zogenaamde NYVAC-KC-C mutant, waarin twee van de 18 verwijderde vaccinia genen zijn teruggeplaatst.
2. Het tweede geval betreft de zogenaamde NYVAC+12-deltaE3L/ATV_h-C. In deze mutant zijn 12 van de 18 verwijderde gensequenties teruggeplaatst. Bovendien is de coderende sequentie voor E3L uit het genoom van NYVAC+12-deltaE3L/ATV_h-C verwijderd en vervangen door het gen dat codeert voor eIF2 afkomstig van het *Ambystoma tigrinum* virus (ATV)(3).
3. Het laatste geval betreft een aantal deletiemutanten, waaruit een of meerdere delen van het NYVAC-C genoom zijn verwijderd.

Het vacciniavirus

Het vacciniavirus behoort tot de familie van de *Poxviridae*, welke is opgebouwd uit twee subfamilies: de *Chordopoxvirinae* en de *Entomopoxvirinae* (4). Deze indeling is gebaseerd op het gastheerbereik van het virus. Alle pokkenvirussen die insecten infecteren vallen onder de *Entomopoxvirinae*. De pokkenvirussen die gewervelde organismen kunnen infecteren vallen onder de *Chordopoxvirinae*. Het vacciniavirus behoort tot deze laatste subfamilie en valt onder het genus van de orthopoxvirussen.

Het genoom van het vacciniavirus wordt gevormd door lineair dubbelstrengs DNA en is opgedeeld in de regionen: C, N, M, K, F, E, P, O, I, G, L, J, H, D, A en B. De genen in iedere regio zijn genummerd en de richting waarin het gen wordt afgelezen wordt aangeduid met een L of R (links of rechts) (4).

In de Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen wordt het vacciniavirus ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2 (5). In de afgelopen jaren is er veel onderzoek gedaan naar de mogelijkheid om recombinant vacciniavirussen te gebruiken als vaccin. Met dit doel zijn er verschillende vacciniavectoren ontwikkeld met een sterk verminderde virulentie, zoals het 'modified vaccinia virus Ankara' en NYVAC.

NYVAC is een sterk verzwakt vacciniavirus en kan zeer slecht repliceren in zoogdiercellen. Deze stam is ontstaan door de specifieke verwijdering van 18 gensequenties uit de vacciniavirusstam Copenhagen (1).

Tabel I: Genen die in NYVAC ontbreken ten opzichte van de vacciniavirusstam Copenhagen

Gen aanduiding	Codeert voor/functie
C7L	Beïnvloedt gastheerbereik, reguleert immuunrespons
C6L	Onbekend eiwit
C5L	Onbekend eiwit
C4L	Onbekend eiwit
C3L	Eiwit dat bindt aan complement factor 4b
C2L	Kelch gelijkend eiwit
C1L	Onbekend eiwit
N1L	Virulentiefactor
N2L	Alpha-amanitine gevoelige determinant
M1L	Ankyrine gelijkend eiwit
M2L	Onbekend eiwit
K1L	Beïnvloedt gastheer bereik, remt NF-kappaB
I4L	Ribonucleotide-reductase
J2R	Thymidine-kinase
A26L	Deel van eiwit dat inclusielichamen vormt
A56R	Viraal hemagglutinine
B13R	Serine-protease remmer gelijkend eiwit
B14R	Serine-protease remmer gelijkend eiwit

Een deel van deze gensequenties is geassocieerd met virulentie (zie tabel I). Dit betreft de genen die coderen voor thymidine-kinase, ribonucleotide-reductase, het complement-bindend eiwit, het virale hemagglutinine en de serine-protease remmers (1 en 8). Uit NYVAC zijn ook de zogenaamde K1L en C7L genen verwijderd. Deze genen spelen een rol bij het gastheerbereik van het vacciniavirus. Van een aantal genen is de functie nog niet beschreven. NYVAC is al meerdere malen gebruikt als recombinant vaccin in pre-klinische en klinische studies (6, 7 en 9).

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2003 twee adviezen uitgebracht over de classificatie van geattenuerde pokkenvirusstammen (10 en 11). In deze adviezen zijn het pokkenvirus MVA ('modified vaccinia virus Ankara'), NYVAC (afgeleid van de 'Copenhagen' vacciniastam) en de avipoxvirussen ALVAC (kanariepokkenvirus) en TROVAC (kippenvirus) door de COGEM ingedeeld in de laagste pathogeniteitsklasse (klasse 1). De COGEM heeft derhalve geadviseerd de laboratoriumwerkzaamheden met NYVAC op ML-I niveau en werkzaamheden in associatie met dieren op DM-I niveau

in te schalen. Bij het hanteren van deze inperkingsniveaus achtte de COGEM aanvullende voorschriften niet noodzakelijk om de veiligheid voor mensen en milieu te waarborgen. Het Center for Disease Control (CDC) en de National Institutes of Health (NIH) in de VS hebben NYVAC ingeschaald op 'biosafety level 1'.

Overweging en advies

Werkzaamheden met NYVAC-KC-C

Voor de vorming van NYVAC-KC-C zijn de genen K1L en C7L aan het genoom van NYVAC-C toegevoegd. Beide aanvragers verstrekken beperkte informatie over de LD₅₀ waarde van deze mutant in muizen en merken op dat de LD₅₀ van NYVAC-KC-C vergelijkbaar is met die van MVA-C en NYVAC-C. Op basis van deze gegevens zijn de aanvragers van mening dat de pathogeniteit van deze mutant hetzelfde is als die van NYVAC-C. Zij vragen daarom de werkzaamheden met NYVAC-KC-C uit te mogen voeren op ML-I niveau en DM-I niveau.

Om een goed oordeel te kunnen vormen over de virulentie van een virus acht de COGEM uitgebreide informatie over de LD₅₀ waarde in muizen belangrijk. Deze informatie is echter niet voldoende. Zij is van mening dat de mate van attenuatie van een virus in muizen sterk kan afwijken van de attenuatie in mensen. Voor de beoordeling van de mate van attenuatie van een virusmutant hecht de COGEM naast de bepaling van de LD₅₀ waarde in zoogdieren ook veel waarde aan gegevens over het gastheerbereik en de mate van replicatie van het virus in cellen van humane origine.

Door toevoeging van C7L wordt het gastheerbereik van NYVAC uitgebreid en is het virus in staat te repliceren in HeLa cellen. Ook K1L is betrokken bij het gastheerbereik van het vacciniavirus en de virusreplicatie in zoogdiercellen. (12, 13 en 14). Het ligt derhalve in de lijn der verwachting dat NYVAC-KC-C ook kan repliceren in humane cellen.

Met het oog op bovenstaande overweging adviseert de COGEM alle laboratoriumwerkzaamheden in te schalen op ML-II niveau, gelijk aan de inschaling voor werkzaamheden met het vacciniavirus Copenhagen. De werkzaamheden met NYVAC-KC-C in combinatie met proefdieren dienen uitgevoerd te worden op DM-II niveau. Om de mogelijke risico's voor mens en milieu afdoende te kunnen inperken, dienen naast de fysische inperking de volgende aanvullende voorschriften in acht genomen te worden:

- I** Er mogen geen medewerkers bij de werkzaamheden betrokken zijn waarvan bekend is dat zij:
- lijden aan eczeem of die in hun naaste omgeving te maken hebben met lijdens aan eczeem;
 - zwanger zijn;
 - geen goed functionerend immuunsysteem hebben.

- II** Handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II uitgevoerd te worden of men dient neus-, mondmasker en veiligheidsbril te dragen.
- III** Tijdens de handelingen dient men handschoenen te dragen.

Werkzaamheden met NYVAC+12-deltaE3L/ATV_h-C

Ten opzichte van NYVAC-C zijn in de mutant NYVAC+12-deltaE3L/ATV_h-C twaalf genen in het genoom teruggeplaatst. Het betreft de genen C7L, C6L, C5L, C4L, C3L, C2L, C1L, N1L, N2L, M1L, M2L en K1L. Tevens is E3L vervangen voor de coderendesequentie voor eIF2 van ATV. Op basis van een studie naar de LD₅₀ waarden in muizen oordeelt de aanvrager dat de pathogeniteit van deze mutant niet groter zal zijn dan van NYVAC-C. Hij is daarom van mening dat deze mutant in pathogeniteitsklasse 1 ingedeeld kan worden en vraagt de laboratoriumwerkzaamheden op ML-I niveau en werkzaamheden in associatie met dieren op DM-I niveau uit te mogen voeren.

Hoewel de aanvrager aangeeft dat de LD₅₀ waarden van NYVAC-C en NYVAC+12-deltaE3L/ATV_h-C in muizen vergelijkbaar zijn, acht de COGEM dit niet voldoende om te kunnen oordelen dat de virulentie van deze mutant vergelijkbaar is met NYVAC-C. Zoals reeds aangegeven voor de mutant NYVAC-KC-C is de COGEM van mening dat de beoordeling van de attenuatie van een virus gebaseerd moet worden op goed beschreven studies naar de LD₅₀ waarden, het gastheerbereik en het replicatieprofiel van het virus in humane cellen. Aangezien aan het genoom van NYVAC+12-deltaE3L/ATV_h-C de genen C7L en K1L toegevoegd zijn, acht de COGEM het zeer waarschijnlijk dat de replicatie van deze variant in humane cellen aanzienlijk hoger zal zijn dan de replicatie van NYVAC-C (12, 13 en 14).

Naast een aantal bekende genen zijn er in het geval van NYVAC+12-deltaE3L/ATV_h-C ook een aantal onbekende genen teruggeplaatst. Deze genen kunnen mogelijk van invloed zijn op de virulentie en het gastheerbereik van deze vacciniavirus mutant. Door dit gebrek aan kennis over de functie van deze genen kan de COGEM niet uitsluiten dat NYVAC+12-deltaE3L/ATV_h-C een virulentie bezit die vergelijkbaar is met de virulentie van de vacciniavirusstam Copenhagen. Afgaande op de aangeleverde LD₅₀ waarden van verschillende NYVAC mutanten blijkt de LD₅₀ waarde van NYVAC+12-deltaE3L/ATV_h-C nauwelijks te verschillen van de LD₅₀ waarde van NYVAC-C. In de situatie dat alleen de bovengenoemde 12 genen aan het NYVAC genoom worden toegevoegd, neemt de pathogeniteit echter aanmerkelijk toe. De LD₅₀ waarde van deze zogenaamde NYVAC+12 mutant is tenminste 1000 maal lager dan de LD₅₀ waarde van NYVAC+12-deltaE3L/ATV_h-C. Dit verschil moet derhalve worden toegeschreven aan de vervanging van E3L door het gen dat codeert voor eIF2 uit ATV. Het is echter niet bekend of en in welke mate deze wijziging eenzelfde effect heeft in mensen.

Bovendien kan deze mutant door een enkele mutatie zijn fitness aanzienlijk verhogen. Een dergelijk fenomeen is al eerder beschreven voor de vacciniavirusstam Copenhagen. De inactivatie van een immuunmodulerend gen in het genoom van dit virus heeft geleid tot een verhoogde virulentie (15). Door het ontbreken van gegevens over de stabiliteit van het genoom of het gebruik van een test op mutaties in het genoom van NYVAC+12-deltaE3L/ATV_h-C, is de COGEM van mening dat er rekening gehouden moet worden met de mogelijkheid van het ontstaan van mutanten die pathogener kunnen zijn dan NYVAC-C.

Gezien bovenstaande overweging is de COGEM van mening dat het niet uitgesloten kan worden dat de virulentie van deze variant hoger is dan de NYVAC-C. De COGEM adviseert daarom NYVAC+12-deltaE3L/ATV_h-C, net als de vacciniavirusstam Copenhagen, in pathogeniteitsklasse 2 in te schalen. Om de veiligheid van mens en milieu te kunnen waarborgen, acht de COGEM het noodzakelijk om de laboratoriumwerkzaamheden op ML-II niveau en de werkzaamheden in associatie met proefdieren op DM-II uit te voeren. Naast de fysische inperking dienen de volgende aanvullende voorschriften in acht genomen te worden:

- I** Er mogen geen medewerkers bij de werkzaamheden betrokken zijn waarvan bekend is dat zij:
 - lijden aan eczeem of die in hun naaste omgeving te maken hebben met lijdens aan eczeem;
 - zwanger zijn;
 - geen goed functionerend immuunsysteem hebben.
- II** Handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II uitgevoerd te worden of men dient neus-, mondmasker en veiligheidsbril te dragen.
- III** Tijdens de handelingen dient men handschoenen te dragen.

Werkzaamheden met deletiemutanten van NYVAC-C

De aanvrager vraagt toestemming om elk denkbare deletiemutant van NYVAC-C te mogen gebruiken op ML-I of DM-I inperkingsniveau. Een aantal mutanten waar een of twee gensequenties uit verwijderd zijn, is reeds getest en de virulentie van deze deletiemutanten blijkt maximaal hetzelfde te zijn als de virulentie van NYVAC-C. De aanvrager leidt hieruit af dat geen enkele deletiemutant een hogere virulentie of pathogeniteit zal vertonen dan de NYVAC-C variant.

De COGEM is van mening dat de deletie van een of meer genen uit het genoom van virussen niet in alle gevallen leidt tot een verzwakt virus. Door de deletie van immuunmodulerende genen kan de pathogeniteit van virussen bijvoorbeeld toenemen. Op deze wijze blijkt de inactivatie van het immuunmodulerende gen B15R de vacciniavirusstam Copenhagen een verhoogde virulentie te hebben gegeven (15).

NYVAC wordt al lange tijd gebruikt als vector in vaccinontwikkeling. In deze periode is er geen mutatie van het NYVAC genoom gerapporteerd, noch is er melding gemaakt van incidenten. De COGEM acht het daarom onwaarschijnlijk dat de virulentie of pathogeniteit van NYVAC door deleties zal kunnen toenemen. De kans dat de attenuatie van NYVAC door een of meer deleties (gedeeltelijk) wordt opgeheven, beschouwt zij op grond van deze overwegingen als verwaarloosbaar klein.

Gezien bovenstaande argumenten is de COGEM van mening dat laboratoriumwerkzaamheden met de NYVAC deletiemutanten uitgevoerd kunnen worden op ML-I niveau. Voor werkzaamheden met deze deletiemutanten in associatie met proefdieren geldt volgens dezelfde redenatie het DM-I niveau. Onder bovengenoemde inperkingsniveaus en de daarbij behorende werkvoorschriften is de veiligheid van mens en milieu afdoende gewaarborgd.

Conclusie

De COGEM adviseert de werkzaamheden met NYVAC-KC-C en NYVAC+12-deltaE3L/ATVh-C uit te voeren op ML-II en DM-II niveau. Met inachtneming van gestelde inperkingsmaatregelen en de voorgestelde aanvullende werkvoorschriften, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu bij uitvoering van de voorgenomen experimenten verwaarloosbaar klein zijn.

De werkzaamheden met deletiemutanten van NYVAC-C adviseert de COGEM in te schalen op ML-I en DM-I niveau. Zij acht de kans verwaarloosbaar klein dat verdere deleties in het NYVAC-C genoom zullen leiden tot een toename van de virulentie.

Referenties

1. Tartaglia J *et al.* (1992) NYVAC: A highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* **188**: 217-232
2. Gomez CE *et al.* (2007) Generation and immunogenicity of novel HIV/AIDS vaccine candidates targeting HIV-1 Env/Gag-Pol-Nef antigens of Clade C. *Vaccine* **25**: 1969-1992
3. Jentarra GM *et al.* (2008) Vaccinia viruses with mutations in the E3L gene as potential replication-competent, attenuated vaccines: Scarification vaccination. *Vaccine* **26**: 2860-2872
4. Knipe DM en Howley PM (eds) *Fields Virology* **Chap 84: Poxviridae: The viruses and their replication** 2849-2883
5. *Regeling genetisch gemodificeerde organismen* (1998) Appendix A
6. Moss B. (1996) Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 11341-48

7. Gomez CE *et al.* (2008) The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr. Gene Ther.* **8**: 97-120
8. Kennedy R en Poland GA (2007) T-Cell epitope discovery for variola and vaccinia viruses. *Rev. Med. Virol.* **17**: 93-113
9. Harari A *et al.* (2008) An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses *JEM* **205**: 63-77
10. COGEM (2003) Classificatie geattenueerde pokkenvirus-stammen en aanvullende voorschriften. CGM/030519-06
11. COGEM (2003) Classificatie geattenueerde pokkenvirusstammen. CGM/030922-04
12. Najera JL *et al.* (2006) Cellular and biochemical differences between two attenuated poxvirus vaccine candidates (MVA and NYVAC) and role of the C7L gene. *J. Vir.* **80**: 6033-6047
13. Perkus ME *et al.* (1990) Vaccinia virus host range genes. *Virology* **179**: 276-286
14. Guerra S *et al.* (2006) Host response to the attenuated poxvirus vector NYVAC: Upregulation of apoptotic genes and NF-kB-responsive genes in infected HeLa cells. *J. Vir.* **80**: 985-998
15. Alcami A en Smith GL (1996). A mechanism for the inhibition of fever by a virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:11029-11034