

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
dhr. J.J. Atsma  
POSTBUS 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 9 mei 2011  
**KENMERK** CGM/110509-01  
**ONDERWERP** Verzoek tot wijziging vergunning vaccinatiestudie met gg-mazelenvirus in makaken

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijzigingsverzoek van vergunning IG 01-287/13 met de titel 'Onderzoek aan mazelenvirus' van het Erasmus Universitair Medisch Centrum te Rotterdam, deelt de COGEM u het volgende mee:


#### **Samenvatting**

De COGEM is verzocht te adviseren over een wijzigingsverzoek van een vaccinatiestudie met genetisch gemodificeerde (gg-) mazelenvirussen bij makaken. De experimenten worden uitgevoerd onder DM-III condities in onderdrukisolatoren. De aanvrager verzoekt om de gevaccineerde apen, 21 dagen na vaccinatie, terug te plaatsen naar D-I inperkingsniveau. De aanvrager zal dit alleen doen als op dag 13 en 17 na vaccinatie geen virus wordt gedetecteerd in bloed, neus- en keeluitstrijkjes.

De vaccinstam kent een lange historie van veilig gebruik, zowel in gezonde individuen als in individuen met een verzwakte afweer. Er zijn naar de mening van de COGEM geen redenen om aan te nemen dat de virulentie of pathogeniteit van de virusstam als gevolg van de verschillende modificaties toeneemt.

De COGEM acht de kans op uitscheiding van het virus na 21 dagen verwaarloosbaar klein. Bovendien zijn de gevolgen van eventuele uitscheiding naar alle waarschijnlijkheid verwaarloosbaar klein gezien het verzwakte karakter van de vaccinvirussen en het feit dat de medewerkers die betrokken zijn bij de experimenten gevaccineerd zijn tegen mazelen.

Op basis van bovenstaande overwegingen kan de COGEM instemmen met het verzoek van de aanvrager. De COGEM is van mening dat de risico's voor mens en milieu bij terugplaatsing van de makaken naar D-I niveau onder de door aanvrager genoemde voorwaarden verwaarloosbaar klein zijn.



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

*Met het oog op eventuele belangenverstrengeling zijn de COGEM leden Prof. dr. R.A.M. Fouchier en dr. ir M.W. Weststrate niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# Verzoek tot wijziging vergunning vaccinatiestudie met gg-mazelenvirus in makaken

## COGEM advies CGM/110509-01

### Inleiding

De onderhavige aanvraag betreft een wijziging op een bestaande vergunning voor mazelen vaccinatiestudies in makaken. Bij deze studies wordt gebruik gemaakt van genetisch gemodificeerde, levend-verzwakte mazelenvirussen (gebaseerd op de Edmonston-Zagreb stam) die het marker gen voor 'Enhanced Green Fluorescent Protein' (EGFP) tot expressie brengen. Het doel van de studie is om het tropisme en de immunogeniciteit van het levend-verzwakte mazelenvirus vaccin te bestuderen in relatie tot de toedieningsroute.

De experimenten worden uitgevoerd onder DM-III condities in onderdrukisolatoren die zijn voorzien van een HEPA filter. Het verzoek tot wijziging betreft het aanpassen van de tijd die de gevaccineerde dieren moeten doorbrengen in de DM-III ruimte. Volgens de aanvrager is het niet wenselijk dat de apen na vaccinatie langdurig in isolatoren gehuisvest blijven. Om die reden verzoekt de aanvrager om 21 dagen na vaccinatie de gevaccineerde apen terug te plaatsen van DM-III naar D-I inperkingsniveau onder voorwaarde dat in de dieren op twee opeenvolgende tijdstippen (dag 13 en dag 17 na vaccinatie) middels RT-PCR geen virus meer aantoonbaar is in bloed, neus of keel.

### Het mazelenvirus

Het mazelenvirus is een zeer besmettelijk virus dat wordt verspreid via aërosolen. De klinische symptomen ontstaan ongeveer twee weken na infectie en bestaan uit koorts, hoesten, neusverkoudheid (coryza) en bindvliesontsteking van het oog (conjunctivitis) gevolgd door de karakteristieke uitslag. Mazelen wordt tevens geassocieerd met immuunsuppressie resulterend in toegenomen vatbaarheid voor opportunistische infecties.<sup>1</sup>

Het mazelenvirus is, ondanks de beschikbaarheid van een veilig en kosteneffectief vaccin, jaarlijks verantwoordelijk voor grote sterfte. In 2008 waren er wereldwijd 164.000 sterfgevallen als gevolg van mazeleninfecties. Meer dan 95% van de sterfgevallen vindt plaats in lage-inkomenslanden met een slecht ontwikkelde gezondheidszorg.<sup>2,3</sup>

### Het mazelenvirus genoom

Het mazelenvirus behoort tot de familie *Paramyxoviridae*, genus *Morbillivirus*. Het virus wordt omgeven door een lipidemembraan en heeft een negatief enkelstrengs RNA genoom. Het genoom bevat zes genen die coderen voor 'nucleocapside' (N), 'phospho' (P), 'matrix' (M), 'fusion' (F), 'haemagglutinin' (H) en 'large' (L) eiwitten. Het nucleocapside eiwit vormt samen met het RNA genoom en het RNA-afhankelijke RNA polymerase, bestaande uit de P en L eiwitten, een zogenaamd ribonucleoproteïne 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 glycoproteïnes H en F bevinden zich in het lipidemembraan en zijn

verantwoordelijk voor de verankering aan, en fusie met de gastheer cel. De expressie van het mazelengenoem volgt een zogenoemde transcriptiegradiënt waarbij de genen die proximaal van de promotor liggen sterker tot expressie komen dan de genen die distaal van de promotor liggen.

### **Levend-verzwakte mazelen vaccins**

Het mazelenvirus werd in 1954 voor het eerst geïsoleerd uit een celcultuur. Uit deze zogenoemde Edmonston wild-type MV stam werd de levend-verzwakte Edmonston-B vaccinstam geproduceerd welke in 1963 op de markt kwam. Later werd deze stam opgevolgd door de meer verzwakte stammen Edmonston-Enders, Edmonston-Zagreb, Edmonston Moraten en Edmonston Schwarz.<sup>1,4,5</sup> Deze vaccinstammen bleken veilig en effectief in de bestrijding van mazeleninfecties. Deze vaccins worden standaard toegediend via een subcutane injectie.

### **Voorgenomen werkzaamheden**

De aanvrager wil verschillende vaccinatie-experimenten uitvoeren gebruikmakend van de levend verzwakte Edmonston-Zagreb (EZ) vaccinstam. Het gaat hierbij om toepassing van de ouderstam en drie verschillende recombinante stammen. Een van de recombinante stammen (rMV<sup>ez</sup>) bevat een stille puntmutatie om deze te kunnen onderscheiden van de niet-recombinante ouderstam (MV<sup>ez</sup>). De andere twee recombinante stammen, genaamd rMV<sup>ez</sup>EGFP(1) en rMV<sup>ez</sup>EGFP(3), bevatten het marker gen voor EGFP. Bij stam rMV<sup>ez</sup>EGFP(1) is het EGFP gen in een zogenoemde 'additional transcription unit' (ATU) geplaatst. Deze ATU bevindt zich voor het gen dat codeert voor het nucleocapside (N). Bij stam rMV<sup>ez</sup>EGFP(3) is de ATU met het EGFP gen geplaatst tussen de genen die coderen voor de P en M eiwitten.

Het project bestaat uit twee experimenten. In het eerste experiment worden vier verschillende groepen makaken intratracheaal geïnoculeerd met een van de hierboven beschreven vaccinstammen in een dosis van 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>. Deze experimenten zullen plaatsvinden op DM-III inperkingsniveau. De dieren zullen gedurende 35 dagen gemonitord worden waarbij op gezette tijden bloed, keel, neus, en BAL (broncho-alveolar lavages) monsters worden verzameld. Deze monsters zullen onder andere worden gebruikt voor de studie van het cellulaire tropisme en de immuunrespons. Het experiment moet uitwijzen of de vier virussen zich *in vivo* vergelijkbaar gedragen. Op basis van dit experiment wordt een van de recombinante EGFP stammen geselecteerd voor het tweede experiment.

In het tweede experiment wordt een van de EGFP stammen toegepast om het effect van de immunisatieroute op het virus tropisme en de immunogeniciteit te bestuderen. Hierbij zullen verschillende immunisatieroutes (subcutaan, intratracheaal en inhalatiemethoden) worden toegepast.

### **Eerdere COGEM adviezen**

De COGEM heeft in 2002 geadviseerd over vaccinatie-experimenten in makaken. Bij deze experimenten zijn de F en H genen uit de Edmonston stam met behulp van diverse recombinante andenovirale vectoren aan de proefdieren toegediend. Deze experimenten zijn toen ingeschaald op

D-II niveau waarbij verschillende aanvullende voorschriften in acht moesten worden genomen. Zo moesten de dieren worden gehuisvest in onderdrukisolatoren en moesten de apen minimaal een week na toediening van het vaccin op D-II niveau gehuisvest blijven.<sup>6</sup>

In 2010 heeft de COGEM geadviseerd over proefdierexperimenten in combinatie met een ander genetisch gemodificeerd *Morbillivirus*: het *Canine distemper virus*. De COGEM heeft in dit advies aangegeven in te kunnen stemmen met het voorgestelde DM-III inperkingsniveau. Vanwege de kans op aërogene transmissie achtte zij het daarbij noodzakelijk dat de dieren werden gehuisvest in een onderdrukisolator voorzien van een HEPA-filter dat gelijktijdig met de isolator kan worden gedesinfecteerd.<sup>7</sup>

### **Overweging en advies**

De aanvrager wil verschillende vaccinatie-experimenten uitvoeren in makaken gebruikmakend van de levend verzwakte Edmonston-Zagreb (EZ) vaccinstam en verschillende recombinanten van deze stam. De vaccinstam kent een lange historie van veilig gebruik, zowel in gezonde individuen als in individuen met een verzwakte afweer, bijvoorbeeld als gevolg van een HIV infectie.<sup>8,9</sup>

Er zijn in de ogen van de COGEM geen redenen om aan te nemen dat de virulentie of pathogeniteit als gevolg van de verschillende modificaties toeneemt. Op de eerste plaats betreft het hier drie modificaties waarvan een stille puntmutatie en twee inserties met een onschadelijke fluorescentie-marker (EGFP). Ten tweede volgt het mazelengenoem een zogenoemde transcriptiegradiënt waarbij de genen proximaal van de promotor sterker tot expressie komen dan de genen distaal van de promotor. Door insertie van EGFP zullen de achterliggende virale genen minder tot expressie komen. De COGEM is van mening dat dit resulteert in een stam die waarschijnlijk minder virulent is.

De aanvrager verzoekt om de gevaccineerde apen 21 dagen na vaccinatie terug te plaatsen naar D-I inperkingsniveau onder voorwaarde dat in de dieren op twee opeenvolgende tijdstippen (dag 13 en dag 17 na vaccinatie) middels RT-PCR geen virus meer aantoonbaar is in bloed, neus of keel. Deze RT-PCR is gevalideerd en in 2005 beschreven in een publicatie van El Mubarak *et al.*<sup>10</sup> De detectiegrens van deze RT-PCR is 0.24 CCID<sub>50</sub>/ml. Dit betekent dat in 50 procent van de monsters van vijf milliliter (ml), één deeltjes wordt waargenomen. De COGEM is van mening dat de RT-PCR een zeer betrouwbare methode is om eventuele uitscheiding van het virus aan te tonen.

In een eerdere studie heeft de aanvrager makaken gevaccineerd met een dosis MV<sup>ez</sup> tot  $1,6 \times 10^4$  CCID<sub>50</sub> (subcutaan of via aërosolen toegediend). De aanvrager heeft toen aangetoond dat het mazelenvirus 13 dagen na vaccinatie niet meer aantoonbaar was in het bovenste deel van het respiratoire kanaal van gevaccineerde makaken die al dan niet immuungecompromiteerd waren. Op dag drie, zes en negen kon geen virusuitscheiding worden aangetoond in het perifeer bloed.<sup>11</sup>

Op grond van deze gegevens acht de COGEM de kans op uitscheiding van het virus na 21 dagen verwaarloosbaar klein. Bovendien zijn de gevolgen van eventuele uitscheiding naar alle waarschijnlijkheid verwaarloosbaar klein gezien het verzwakte karakter van de vaccinvirussen en

het feit dat de medewerkers die betrokken zijn bij de experimenten gevaccineerd zijn tegen mazelen.

Persistentie van het mazelen vaccivirus in makaken is volgens de aanvrager nog nooit waargenomen in experimentele settings. Daarom, en vanwege de aard van het verzwakte virus acht de COGEM monitoring van makaken op de aanwezigheid van recombinante mazelen virussen op D-I inperkingsniveau niet noodzakelijk.

### **Conclusie**

Op basis van bovenstaande overwegingen kan de COGEM instemmen met het verzoek van de aanvrager om de gevaccineerde apen 21 dagen na vaccinatie terug te plaatsen naar D-I niveau indien op twee opeenvolgende dagen (dag 13 en 17) na vaccinatie geen virus meer aantoonbaar is in bloed, neus of keel. Dit betekent dat wanneer op dag 13 een positief resultaat wordt behaald, deze periode opschuift naar de volgende twee opeenvolgende meetpunten met tussenposes van vier dagen. De COGEM is van mening dat de risico's voor mens en milieu bij terugplaatsing van de makaken naar D-I niveau onder de door aanvrager genoemde voorwaarden verwaarloosbaar klein zijn.

### **Referenties**

1. Griffin DE (2007). Measles virus. In: Fields virology, volume two, fourth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp1401-1441
2. [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/) (26-05-11)
3. WHO (2009). Global reductions in measles mortality 2000-2008 and the risk of measles resurgence. *Wkly Epidemiol Rec* 84: 509-516
4. Ravanfar *et al.* (2009). Existing antiviral vaccines. *Dermatol Ther.* 22:110-28
5. De Vries *et al.* (2008). Measles vaccination: new strategies and formulations. *Expert Rev Vaccines.* 7:1215-23
6. COGEM (2002). Evaluatie van een kandidaat nieuw mazelen vaccin gebaseerd op een replicatie-deficiënte. COGEM advies CGM/020513-03 recombinant adenovirale vector in cynomolgus apen.
7. COGEM (2010). Classificatie van Canine distemper virus. COGEM advies CGM/100616-01
8. Moss *et al.* (2003). Immunization of children at risk of infection with human immunodeficiency virus. *Bul World Health Organ* 81:61-70
9. WHO (2004) Measles vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 79: 130-142
10. El Mubarak *et al.* (2005). Development of a semi-quantitative real-time RT-PCR for the detection of measles virus. *J Clin Virol* 4: 313-7
11. De Swart *et al.* (2006). Aerosol measles vaccination in macaques: Preclinical studies of immune responses and safety. *Vaccine* 24: 6424–6436