

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

DATUM 10 december 2012
KENMERK CGM/121210-01
ONDERWERP Advies: Experimenten met onbekende adenovirussen uit mensapen

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 04-017/03 met de titel 'Constructie en productie van host-range gemodificeerde adenovirus vectoren' van het Academisch Ziekenhuis Leiden, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De aanvrager heeft een vergunning voor het vervaardigen van genetisch gemodificeerde (gg-) virale vectoren als genoverdrachtsysteem, op basis van humane adenovirussen. Nu wil de aanvrager ook met nieuwe, nog te karakteriseren adenovirussen uit mensapen werken. Door nieuwe adenovirussen uit apen als basis voor virale vectoren te gebruiken, hoopt de aanvrager de bestaande immuniteit tegen adenovirussen in de bevolking te omzeilen. De adenovirussen zullen worden geïsoleerd uit de fecaliën van chimpansees, bonobo's en gorilla's. De te betrekken apen leven in gevangenschap en vertonen geen symptomen van ziekte. De virale vectoren zullen replicatiedeficiënt worden gemaakt door het E1 gen, dat verantwoordelijk is voor onder andere het induceren van virale replicatie, te verwijderen.

Adenovirussen worden gekenmerkt door een gastheerbereik dat is beperkt tot één soort of nauw verwante soorten. Infecties met adenovirussen verlopen doorgaans zonder symptomen of met een lichte verkoudheid, hoewel patiënten of dieren met een verzwakt immuunsysteem ziek kunnen worden. Alle eerder geclassificeerde adenovirussen zijn voor gg-werkzaamheden ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.

De COGEM acht de kans zeer klein dat de te isoleren adenovirussen voor de mens pathogener zullen zijn dan eerder beschreven primatenadenovirussen, op grond van de lage pathogeniteit van adenovirussen; de verwachte overeenkomsten tussen de nieuwe adenovirussen uit apen en reeds bekende apen- en humane adenovirussen; en het feit dat de te betrekken apen asymptomatisch zullen zijn en in nauw contact staan met mensen. De nieuwe adenovirussen uit apen kunnen daarom behandeld worden als klasse 2 pathogeen. Om transmissie van gg-adenovirussen uit apen naar de mens te voorkomen, adviseert de COGEM enkele aanvullende maatregelen.

Met inachtneming van de voorgeschreven inperkingsmaatregelen en aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu, verbonden aan de productie van en werkzaamheden met replicatiedeficiënte vectoren op basis van nieuw te isoleren adenovirussen uit mensapen, 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 belangverstrengelingen is het COGEM lid prof. dr. R.C. Hoeben niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Experimenten met onbekende adenovirussen uit mensapen

COGEM advies CGM/121210-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een aanvraag tot wijziging van de vergunning voor de constructie en productie van virale vectoren op basis van adenovirussen. Van deze virale vectoren wordt de gastheerspecificiteit veranderd door middel van mutaties in capsid-eiwitten en uitwisselingen van de aanhechtingseiwitten of 'fibers' tussen verschillende adenovirale serotypen. De aanvrager heeft al een vergunning voor virale vectoren op basis van *Humaan adenovirus* serotype 5, 12 of 35. De aanvrager wil nieuwe nog te karakteriseren adenovirussen, die geïsoleerd zullen worden uit mensapen, aan deze vergunning toevoegen. Door nieuwe adenovirussen uit apen als basis voor virale vectoren te gebruiken, hoopt de aanvrager de bestaande immuniteit tegen adenovirussen in de bevolking te omzeilen.

Adenoviridae

Adenovirale vectoren zijn afgeleid van adenovirussen (*Adenoviridae*, genus *Mastadenovirus*) en worden veelvuldig gebruikt als een effectief genoverdrachtsysteem. Er bestaan 54 verschillende serotypes humane adenovirussen, welke geclassificeerd kunnen worden in zeven zogenaamde 'soorten' (A tot en met G).¹ Adenovirussen hebben een gastheerbereik dat beperkt is tot één of tot nauw verwante soorten.^{2,3} Adenovirussen kunnen de luchtwegen, het maag-darmstelsel en soms de ogen infecteren.⁴ Een infectie verloopt meestal asymptomatisch of met lichte verkoudheidssymptomen, zonder noodzaak tot medische behandeling.⁵ De infectie is doorgaans zelflimiterend. Bij patiënten met een sterk verzwakt afweersysteem kunnen echter ontstekingen aan de nieren en longen ontstaan met mogelijk fatale gevolgen.³

Structuur en genomische organisatie van adenovirussen

Adenovirale deeltjes bestaan uit een lineair dubbelstrengs DNA molecuul omgeven door een eiwitmantel.^{2,3} De eiwitmantel bestaat uit capsid-eiwitten met zogenaamde 'fibers', die uitsteken boven het manteloppervlak. De 'fibers' hebben een steel en een kleine kop, waarmee ze binden aan een receptor op de gastheercel.

De genomen van adenovirussen zijn onderverdeeld in een zogenaamde vroege (Early) en late (Late) regio. De vroege regio komt kort na binnenkomst van het virus in de cel tot expressie. De late regio komt pas tot expressie als de DNA-replicatie gestart is. De vroege regio bestaat uit vijf transcriptie-units (E1A, E1B, E2, E3 en E4). De E1A eiwitten zijn betrokken bij de inductie van virale replicatie en expressie van de overige vroege en late genen. De E1B eiwitten beschermen de gastheercel tegen geprogrammeerde celdood (apoptose). De E2 regio codeert voor eiwitten noodzakelijk voor replicatie van het virale genoom. De E3 eiwitten blokkeren de afweerreactie tegen het virus.^{2,3,6} De E4 regio tenslotte, codeert voor een aantal eiwitten die betrokken zijn bij het controleren van de celcyclus.²

Adenovirale vectoren

Voor de vervaardiging van zogenaamde eerste generatie adenovirale vectoren wordt de *E1* regio uit het adenovirusgenoom uitgewisseld met het gen van interesse.² Daarnaast wordt ook vaak (een deel van) de *E3* regio verwijderd. Bij adenovirale vectoren van de tweede generatie zijn hiernaast (delen van) de *E2* en/of de *E4* regio weggehaald.²

Aangezien het virus na verwijdering van de *E1* regio niet meer in staat is tot replicatie, is een helpercellijn noodzakelijk voor productie van de vectoren. Voor de vervaardiging van de adenovirale vectoren uit onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van de helpercellijnen PER.C6, HEK293, 911 en afgeleiden van deze cellen. In deze cellen komt onder andere de *E1* regio tot expressie.

Werkzaamheden

De aanvrager wil de bestaande immuniteit tegen adenovirussen in de bevolking omzeilen, door nieuwe adenovirussen uit apen als basis voor virale vectoren te gebruiken. De adenovirussen zullen worden geïsoleerd uit de fecaliën van de mensapen chimpansee, bonobo en gorilla. De te betrekken apen leven in gevangenschap en vertonen geen symptomen van ziekte. Er zal worden onderzocht tot welke adenovirale ‘soorten’ de isolaten behoren, waarna de aanvrager isolaten van soort C en/of E wil selecteren voor vectorontwikkeling. Adenovirussen van de soorten C en E zijn eerder gebruikt als vector voor de ontwikkeling van vaccins. Het complete virale genoom zal worden gekloneerd, waarna *E1* deletiemutanten worden gemaakt om de virussen replicatiedeficiënt te maken. Uit de *E1* deletiemutanten worden mogelijk ook andere sequenties verwijderd. Met behulp van de zo ontstane virale vectoren wordt gastheerspecificiteit bestudeerd. Bovendien zullen ‘fibers’ tussen verschillende typen adenovirussen worden uitgewisseld en worden capsid-eiwitten gemodificeerd.

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft eerder geadviseerd over een enigszins vergelijkbare vergunningaanvraag, die nieuw geïsoleerde polyomavirussen uit apen betrof.⁷ Op grond van de beperkte pathogeniteit van al bekende polyomavirussen bij niet-humane primaten en de afwezigheid van symptomen bij de apen en de verzorgers van deze apen, achtte de COGEM het onwaarschijnlijk dat de nieuwe primatenpolyomavirussen een hogere pathogeniteit zullen bezitten dan de bekende primatenpolyomavirussen. Daarom adviseerde zij de nieuwe primatenpolyomavirussen ook in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

Overweging

Pathogeniteitsklasse onbekende apenadenovirussen

Adenovirussen worden gekenmerkt door een gastheerbereik dat is beperkt tot één soort of nauw verwante soorten. Infecties met adenovirussen verlopen doorgaans asymptomatisch, hoewel patiënten of dieren met een verzwakt immuunsysteem ziek kunnen worden. Alle eerder geclassificeerde adenovirussen zijn voor gg-werkzaamheden ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.

Er zijn verschillende studies uitgevoerd naar nieuwe adenovirussen uit apen, waarbij de virussen geïsoleerd werden uit apen zonder symptomen van virale infectie.^{8,9,10,11} Het betreft hier zowel apen die in het wild als in gevangenschap leefden. Fylogenetische stambomen hebben uitgewezen dat de nieuwe adenovirussen uit apen in te delen zijn bij de verschillende soorten waarin ook humane adenovirussen worden ingedeeld. De virussen uit apen bezitten eigenschappen die eerder zijn aan de bekende humane adenovirussen.

De aanvrager is van plan adenovirussen te isoleren uit apen in gevangenschap. Deze apen zullen geen symptomen vertonen van ziekte door adenovirussen. De verzorgers van deze apen worden regelmatig blootgesteld aan eventueel aanwezige ziekteverwekkers uit deze apen. Er zijn bij de COGEM geen gevallen bekend dat mensen die in contact waren met apen, geïnfecteerd zijn door een adenovirus uit apen. Wel is er een geval bekend, waarbij een nieuw adenovirus bij een kolonie rode springaapjes in gevangenschap tot een heftige uitbraak van longontsteking leidde met een hoge letaliteit.¹² Van dit adenovirus is de natuurlijke gastheer nog onbekend.

De COGEM merkt op dat er nooit volledige zekerheid gegeven kan worden over de pathogeniteit van onbekende virussen, totdat zij gekarakteriseerd zijn. Echter, op grond van de lage pathogeniteit van adenovirussen, de verwachte overeenkomsten tussen de nieuwe adenovirussen uit apen en reeds bekende apen- en humane adenovirussen, en het feit dat de te betrekken apen asymptomatisch zullen zijn en in nauw contact staan met mensen, acht de COGEM de kans zeer klein dat de te isoleren adenovirussen voor de mens pathogener zullen zijn dan eerder beschreven primatenadenovirussen. Zij ziet daarom geen redenen om de uit mensapen te isoleren adenovirussen in een hogere pathogeniteitsklasse in te delen dan andere tot nu toe geclassificeerde primatenadenovirussen.

Gezien het bovenstaande, is de COGEM van mening dat werkzaamheden met deze nieuwe adenovirussen uit apen kunnen plaatsvinden op ML-II inperkingsniveau.

Het is niet geheel uitgesloten dat de nieuwe apenvirussen of afgeleide recombinanten mensen kunnen infecteren vanwege hun nauwe verwantschap met humane adenovirussen. Infecties zullen hoogstwaarschijnlijk in een asymptomatisch verloop resulteren. Gezien de ongewenstheid van een mogelijke transmissie van gg-adenovirussen uit apen naar mensen, acht de COGEM van belang om inademing van infectieuze aerosolen door werknemers te voorkomen. Ze wijst daarom op de volgende aanvullende voorschriften, die standaard zijn voor werkzaamheden met adenovirussen:

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

Het kloneren van de delen van de genomen van de nieuwe adenovirussen kan uitgevoerd worden onder ML-I inperkingsniveau conform de Regeling ggo.

Ontstaan van recombinant replicatiecompetent adenovirus

De aanvrager wil van de geïsoleerde apenvirussen replicatiedeficiënte vectoren maken door het E1 gen te verwijderen. Hierbij is er kans op het ontstaan van replicatiecompetent adenovirus (RCA), indien homologe recombinatie plaats kan vinden met E1 uit de helpercellijnen, waarin het virus wordt vermeerderd.

De aanvrager geeft aan dat de wildtype geïsoleerde apenadenovirussen op helpercellijnen zullen worden vermeerderd, en dat hierbij de vorming van recombinant replicatiecompetent apenadenovirus met humane E1 eiwitten niet uitgesloten kan worden. Hoewel het onwaarschijnlijk is dat dit resulteert in hogere pathogeniteit, acht de COGEM het niet raadzaam om de wildtype apenadenovirussen op helpercellijnen te vermeerderen. De COGEM merkt op dat werkzaamheden met wildtype virussen in principe niet onder de ggo-wetgeving vallen.

Het vermeerderen van replicatiedeficiënte virale vectoren op basis van de onbekende apenvirussen zal met helpercellijnen PER.C6, 911 of 293 plaatsvinden. De aanvrager geeft aan dat door deletie van de E1 regio's uit de onbekende apenvirussen er geen homologe recombinatie op kan treden in PER.C6 cellen met herstel van de replicatie van het virus tot gevolg. Hier is wel een geringe kans op in de oudere helpercellijnen 911 en 293. Daarom zullen alle helpercellijnen periodiek getest worden op de vorming van RCA met een gevoelige methode, zoals voorgeschreven in de huidige vergunning.

Omdat gewerkt zal worden met replicatiedeficiënte vectoren en homologe recombinatie grotendeels uitgesloten kan worden, kunnen werkzaamheden met de replicatiedeficiënte adenovirale vectoren op basis van de nieuwe apenadenovirussen volgens de COGEM plaatsvinden op ML-I inperkingsniveau. Mocht er onverhoopt RCA ontstaan, dan zal deze worden gedetecteerd door middel van de methode zoals de aanvrager deze hanteert onder de huidige vergunning.

Met inachtneming van bovenstaande inperkingsmaatregelen en aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu, verbonden aan de productie van en werkzaamheden met replicatiedeficiënte vectoren op basis van nieuw te isoleren adenovirussen uit mensapen, verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. King AMQ *et al.* (editors) (2012). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Elsevier Academic Press
2. McConnell M.J & Imperiale, M.J. (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. Hum. Gene Ther. 15:1022-1033
3. Knipe DM & Howley PM (2001). Fields virology, volume two, fourth edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
4. Vorburger SA & Hunt KK (2002). Adenoviral gene therapy. Oncologist 7: 46-59
5. Brew BJ & Garrick R (1987). Gliomas presenting outside the central nervous system. Clin Exp Neurol 23: 111-117
6. Miller DL *et al* (2006). Adenovirus type 5 exerts genome-wide control over cellular programs

- governing proliferation, quiescence, and survival. *Genome Biology* 8:R58
7. COGEM (2007). Replicatie en transformatie eigenschappen van nieuwe primaten polyomavirussen. Advies CGM/071127-01
 8. Roy *et al.* (2011). Creation of a panel of vectors bases on ape adenovirus isolates. *J Gene Med* 13:17-25
 9. Roy *et al.* (2012). Adenovirus in fecal samples of asymptomatic rhesus macaques, United States. *Emerg Infect Dis* 18:1081-1088
 10. Bányai *et al.* (2010). Molecular detection of novel adenoviruses in fecal specimens of captive monkeys with diarrhea in China. *Vet Microbiol* 142:416-419
 11. Wevers *et al.* (2011). Novel adenoviruses in wild primates: a high level of genetic diversity and evidence of zoonotic transmissions. *J Virol* 85:10774-10784
 12. Chen *et al.* (2011). Cross-species transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia outbreak in a new world monkey colony. *PLoS pathogens* 7:e1002155