

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw S.A.M. Dijkma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 06 september 2016
KENMERK CGM/160906-01
ONDERWERP Advies: Classificatie van en inschaling van werkzaamheden met chimpansee adenovirus type 3

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag (IG 16-156_2.8-000) over de classificatie van chimpansee adenovirus type 3 (ChAd3) en de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd ChAd3 deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van chimpansee adenovirus type 3 (ChAd3) en de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-)ChAd3.

De aanvrager wil een vaccin tegen tuberculose ontwikkelen op basis van ChAd3 en deze testen in resus (*Macaca mulatta*) en Java apen (*Macaca fascicularis*). Daartoe wordt ChAd3 zodanig aangepast dat het niet meer kan vermeerderen en specieke eiwitten van de tuberculosebacterie tot uiting brengt om een afweerreactie teweeg te brengen.

ChAd3 is nauw verwant aan simian- en humane adenovirussen. Uit de aanwezigheid van afweerstoffen tegen chimpansee adenovirussen in mensen, blijkt dat deze virussen in staat zijn mensen te infecteren. Ziekteverschijnselen bij apen en mensen ten gevolge van infectie door ChAd3 zijn tot op heden niet beschreven in de wetenschappelijke literatuur. Op grond van deze argumenten adviseert de COGEM om ChAd3 in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

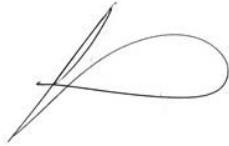
Om kruisbesmetting tussen adenovirussen van apen en van mensen en blootstelling aan gg-ChAd3 te voorkomen, en omdat apen niet in filtertopkooien gehuisvest kunnen worden, stemt de COGEM in met een inschaling op DM-III inperkingsniveau voor de werkzaamheden met apen, onder toepassing van enkele aanvullende voorschriften. Om het risico op blootstelling aan gg-ChAd3 te verlagen adviseert de COGEM werkzaamheden met lichaamscellen van de gevaccineerde apen in te schalen op ML-II, onder inachtneming van enkele aanvullende voorschriften.

Op deze inperkingsniveau's en onder navolging van enkele aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verbonden aan bovengenoemde werkzaamheden verwaarloosbaar klein.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Classificatie van en inschaling van werkzaamheden met chimpansee adenovirus type 3

COGEM advies CGM/160906-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van vergunningaanvraag IG 16-156, getiteld: 'Gebruik van chimpansee adenovirus 3 (ChAd3) als virale vector voor vaccinatie doeleinden', is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie van het chimpansee adenovirus type 3 (ChAd3). De aanvrager wil een op dit virus gebaseerd vaccin voor tuberculose in resus (*Macaca mulatta*) en Java apen (*Macaca fascicularis*) onderzoeken. De COGEM is gevraagd de werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg)-ChAd3 in deze apen, en de laboratoriumwerkzaamheden met cellen uit deze apen in te schalen.

1.2 Adenovirus

Adenovirale vectoren zijn afgeleid van adenovirussen (*Adenoviridae*, genus *Mastadenovirus*) en worden veelvuldig gebruikt als een effectief genoverdrachtsysteem. Adenovirussen komen voor bij onder andere mensen, apen, knaagdieren, honden, runderen en vogels. Adenovirussen hebben een gastheerbereik dat beperkt is tot één of enkele nauw verwante soorten.^{1,2,3} Het genus omvat 27 verschillende soorten, waarvan zeven soorten humane adenovirussen (A tot en met G). Adenovirussen geïsoleerd uit chimpansees zijn fylogenetisch over het algemeen nauw verwant met humane adenovirussen (HAd). In de soorten HAd B, C, E en G komen virussen voor die zowel uit mensen als apen zijn geïsoleerd.⁴ Simian adenovirussen (SAd) afkomstig van 'apen van de Oude Wereld' (voornamelijk uit Afrika en Azië) vormen drie aparte soorten (SAd A tot en met C).⁵

Adenovirussen kunnen de luchtwegen, het maag-darmstelsel en soms de ogen infecteren.⁶ Een infectie verloopt meestal asymptomatisch of met lichte verkoudheidssymptomen, zonder noodzaak tot medische behandeling.⁷ 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.⁴ Infectie met humane adenovirussen kan plaats vinden via direct contact, via besmette faeces of urine en tengevolge van aerogene transmissie.^{4,8}

1.3 Structuur en genomische organisatie van adenovirussen

Adenovirusdeeltjes bestaan uit een lineair dubbelstrengs DNA molecuul omgeven door een eiwitmantel.^{1,2} De eiwitmantel bestaat uit capsid-eiwitten waarin zogenaamde 'fibers' verankerd zijn. Deze fibers steken uit boven het manteloppervlak en 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.^{1,2,9} De E4 regio

tenslotte, codeert voor een aantal eiwitten die betrokken zijn bij het controleren van de celcyclus.¹ De late regio bevat genen die coderen voor structurele eiwitten die betrokken zijn bij de opbouw van het virusdeeltje.¹

1.4 Chimpanse adenovirus type 3

Het Chimpanse adenovirus type 3 (ook bekend als Pan troglodytes adenovirus type 3) is, zoals de naam al suggereert, afkomstig uit een chimpansee. In een publicatie van Dicks *et al.* uit 2012 wordt het ChAd3 onder de soort *Human adenovirus C* geschaard, waartoe ook humaan adenovirus type 5 (HAd5) behoort.¹⁰ Het is op dit moment nog niet bekend hoe de International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) dit virus taxonomisch indeelt. Virussen behorend tot humaan adenovirus C kunnen milde infecties in de bovenste luchtwegen veroorzaken, maar een infectie verloopt minstens zo vaak symptomvrij. Voor zover bekend zijn in de wetenschappelijke literatuur geen ziekteverschijnselen in apen beschreven ten gevolge van een infectie met ChAd3.

Overdracht van (non)human primate adenovirussen naar de mens wordt regelmatig gerapporteerd.¹¹ Ook voor chimpansee adenovirussen zijn er aanwijzingen dat ze mensen kunnen infecteren. Onderzoek naar de aanwezigheid van neutraliserende antilichamen tegen drie chimpansee adenovirussen (ChAd1, ChAd6 en ChAd68) heeft uitgewezen dat deze in 2-20% van de populatie in Sub-Sahara Afrika aantoonbaar zijn. In mindere mate is dit ook het geval bij mensen uit de Verenigde Staten (2-4% prevalentie) en Thailand (1.5-3% prevalentie).¹² In een soortgelijk onderzoek in Brazilië zijn neutraliserende antilichamen tegen ChAd6 en ChAd68 gevonden in 21-23.5% van de mensen.¹³ In deze studies zijn geen symptomen in mensen beschreven die gerelateerd kunnen zijn aan een mogelijke blootstelling aan chimpansee adenovirussen. Over de prevalentie van ChAd3 in mensen is in de huidige wetenschappelijke literatuur geen informatie aanwezig.

Genetisch gemodificeerd, replicatiedeficiënt ChAd3 is recent als vaccin tegen het ebolavirus getest in klinische studies (fase 1 en 1/2a).^{14,15} In beide klinische studies werden alleen milde of gematigde, systemische ‘adverse events’ gerapporteerd. Het betrof met name kortdurende koorts, vermoeidheid en hoofdpijn. In beide studies werden in het bloedplasma antilichamen tegen het ebola virusvaccin gevonden, die na 6 maanden nog gedetecteerd konden worden.

2. Te gebruiken genetisch gemodificeerde organismen

2.1 Genetisch gemodificeerd ChAd3

De aanvrager is van plan een gg-ChAd3 virus te gebruiken voor een vaccinatiestudie tegen tuberculose. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een recombinant E1-gedeleteerd ChAd3 dat een fusieproduct van 5 verschillende antigenen van *Mycobacterium tuberculosis* tot expressie brengt (ChAd3-5ag). Door de deletie van regio E1 is het virus niet in staat te repliceren. Daarnaast is in ChAd3-5ag de regio E4 vervangen door humaan Ad5 E4 ORF6 om een efficiënte replicatie te bewerkstelligen tijdens het productieproces. De productie van ChAd3-5ag wordt door een externe partij gedaan.

2.2 Genetisch gemodificeerd MVA

Naast gg-ChAd3 wil de aanvrager ook gebruik maken van een recombinante Modified Vaccinia Ankara (MVA) vector. MVA is een geattenueerde substrain van het vacciniavirus.¹⁶ Het recombinante MVA (MVA-5ag) bevat een insert met 5 *M. tuberculosis* antigenen. Anders dan in ChAd3-5ag bevatten de antigen-coderende sequenties in MVA-5ag elk een eigen promotor.

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil ChAd3-5ag gebruiken als experimenteel vaccin voor tuberculose in resus (*Macaca mulatta*) en Java apen (*Macaca fascicularis*). Het gg-virus zal geleverd worden door een externe partij. De aanvrager stelt dat er een replicatiecompetent adenovirus assay (RCA) uitgevoerd zal worden voorafgaand aan de studie, om aan te tonen dat er geen replicerend virus aanwezig is.

Het vaccinatie protocol bestaat uit een 'prime-boost', waarbij de dieren worden 'geprimed' met ChAd3-5ag, gevolgd door een 'boost' met MVA-5ag. Na de vaccinatie worden de dieren 'gechallenged' met *M. tuberculosis* om de effectiviteit van de vaccinatie te onderzoeken. Tenslotte wil de aanvrager laboratoriumwerkzaamheden uitvoeren met immuun cellen uit bloed, longen en andere weefsels van de gevaccineerde apen.

4. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

- a) het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant,
- b) het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen,
- c) het micro-organisme behoort tot een soort die vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie,
- d) van het micro-organisme is het niet-virulente karakter door middel van adequate tests aangetoond.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 3 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 4 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Naast de pathogeniteitsklasse-indeling wordt bij de inschaling van ggo-werkzaamheden met virussen of virale sequenties in Bijlage 5 van de Regeling ggo ook onderscheid gemaakt tussen virussen die strikt dierpathogeen zijn, en virussen die pathogeen zijn voor mens en dier.

In Bijlage 4 van de Regeling ggo is een lijst van virussen opgenomen met de pathogeniteitsklasse waarin zij ingedeeld zijn. Tevens wordt voor ieder van de virussen in deze Bijlage aangegeven of zij tot de groep van humaan- en dierpathogene virussen of de groep van strikt dierpathogene virussen worden gerekend.

In 2014 heeft de COGEM in een advies beschreven aan welke criteria een virus moet voldoen om als strikt dierpathogeen virus aangemerkt te worden.¹⁷ De definitie die zij hiervoor hanteert, luidt als volgt:

Een strikt dierpathogeen virus is een virus met een dier als primaire gastheer waarbij infectie, al dan niet gevolgd door ziekte, bij de mens nooit is waargenomen, tenzij onder uitzonderlijke omstandigheden.

5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over ChAd3. Wel heeft zij in 2012 geadviseerd om onbekende adenovirussen afkomstig van apen in te delen in pathogeniteitsklasse 2 en werkzaamheden met adenovirussen uit apen in te schalen op inperkingsniveau ML-II met de volgende twee aanvullende voorschriften; open handelingen dienen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet van klasse-II en het dragen van handschoenen is verplicht. Kloneringswerkzaamheden met de replicatie-deficiënte adenovirale vectoren konden volgens de COGEM plaatsvinden op ML-I inperkingsniveau.¹⁸

In 2013 heeft de COGEM geadviseerd over 11 adenovirussen. Hiervan waren twee adenovirussen afkomstig van apen en deze zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. De COGEM adviseerde om het kloneren van delen van het genoom van de simian adenovirussen op ML-I inperkingsniveau in te schalen en de productie van virale vectoren en transfectie in dierlijke cellen uit te voeren op ML-II niveau. Daarbij achtte de COGEM het van belang dat alle open handelingen uitgevoerd worden in een veiligheidskabinet klasse-II en dat de medewerkers tijdens de werkzaamheden handschoenen dragen.¹⁹

In 2015 heeft de COGEM geadviseerd over de pathogeniteitsklasse van vier adenovirussen afkomstig van apen. Ook deze adenovirussen heeft de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.²⁰

6. Overweging en advies

6.1 Classificatie

ChAd3 is nauw verwant aan of moet geschaard worden onder *Human adenovirus C*. Een infectie met adenovirussen behorend tot humaan adenovirus C is vaak zelflimiterend en verloopt dikwijls asymptomatisch of met lichte verkoudheidssymptomen, zonder noodzaak tot medische behandeling. Voor zover bekend, zijn er in de wetenschappelijke literatuur geen aanwijzingen dat ChAd3 ziekteverschijnselen veroorzaakt in chimpansees.

Er zijn aanwijzingen dat chimpansee adenovirussen zich kunnen verspreiden naar de humane populatie, aangezien er neutraliserende antilichamen tegen deze virussen in mensen gevonden zijn. Vanwege de nauwe verwantschap tussen ChAd3 en humane of andere chimpansee adenovirussen, acht de COGEM de kans groot dat ChAd3 van aap op mens overgedragen kan worden.

Op grond van bovenstaande informatie adviseert de COGEM om ChAd3 niet als strikt dierpathogeen aan te merken en dit virus, in overeenstemming met met de tot nu toe geclassificeerde primaten adenovirussen, in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

6.2 Inschaling van in vivo werkzaamheden

De aanvrager wil apen vaccineren met gg-ChAd3 en gg-MVA en vervolgens cellen uit deze apen analyseren in het laboratorium. De COGEM merkt op dat de technische informatie over het vaccinatieprotocol, waaronder de wijze van toediening en de dosering, niet is aangeleverd. Tevens ontbreekt informatie over de kwaliteitscontrole van de toe te dienen batches van gg-ChAd3 en gg-MVA. Hoewel werkzaamheden met gg-MVA, conform de regeling BGGGO (bijlage 5, art. 5.4.2) ingeschaald kunnen worden op inperkingsniveau ML-I/DM-I, betreft het in voorgenomen studie een combinatie van beide ggo's en zijn de afzonderlijke handelingen met deze ggo's daarom door de COGEM als één activiteit beoordeeld en ingeschaald. In dit kader is het mogelijke milieurisico van de *in vivo* werkzaamheden bepaald aan de hand van de kans dat er door complementatie van en/of recombinatie met gg-ChAd3 nieuwe virusdeeltjes worden gevormd en door de apen worden uitgescheiden.

Replicatie en eventuele uitscheiding van gg-ChAd3 is alleen mogelijk als de ontbrekende E1 en E4 domeinen door een wildtype adenovirus gecomplementeerd worden. De COGEM acht de kans groot dat de apen endogene adenovirussen bij zich dragen. Hierdoor kan de COGEM replicatie en uitscheiding van gg-ChAd3 niet uitsluiten. De mogelijke aanwezigheid van endogene adenovirussen kan er ook toe leiden dat door recombinatie met gg-ChAd3 nieuwe gg-adenovirussen ontstaan.

Op basis van bovenstaande en omdat apen niet in filtertopkooien gehuisvest kunnen worden, stemt de COGEM ermee in om de werkzaamheden met apen op DM-III inperkingsniveau in te schalen. Ter voorkoming van eventuele overdracht van de ggo's naar de medewerkers, kan zij tevens instemmen met het volgende voorgestelde aanvullende voorschrift:

- Tijdens de werkzaamheden wordt een mond- en neuskapje, P2 of hogere specificatie, en een veiligheidsbril gedragen.

Op dit inperkingsniveau en onder navolging van bovenstaand aanvullend voorschrift is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu, verbonden aan het gebruik van ggo's bij de voorgenomen werkzaamheden in apen verwaarloosbaar klein zijn.

6.3 Inschaling van in vitro werkzaamheden

Bij de *in vitro* werkzaamheden hanteert de COGEM dezelfde overweging omtrent complementatie en recombinatie van het virus als bij de *in vivo* werkzaamheden. Vanwege de standaard aanvullende voorschriften die bij aerogeen overdraagbare virussen voorgeschreven worden, is de COGEM echter van mening dat het ggo voldoende wordt ingeperkt op ML-II. Derhalve adviseert zij de werkzaamheden met animale cellen in te schalen op ML-II en daarbij de volgende standaard aanvullende voorschriften te hanteren:

- Open handelingen dienen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet van klasse-II.
- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen.

Op inperkingsniveau ML-II en bovenstaande standaard aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu, verbonden aan de *in vitro* werkzaamheden met de cellen verkregen uit gevaccineerde apen, verwaarloosbaar klein zijn.

7. Referenties

1. McConnell MJ & Imperiale, MJ (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 15: 1022-1033
2. Knipe DM & Howley PM (2001). *Fields virology*, volume two, fourth edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
3. Davison AJ *et al.* (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J. Gen. Virol.* 84: 2895-2908
4. 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
5. Malouli D *et al.* (2015). Full genome sequence analysis of a novel adenovirus of rhesus Macaque origin indicates a new simian adenovirus type and species. *Virol. Rep.* 3-4: 18-29
6. Vorburger SA & Hunt KK (2002). Adenoviral gene therapy. *Oncologist* 7:46-59
7. Brew BJ & Garrick R (1987). Gliomas presenting outside the central nervous system. *Clin. Exp. Neurol.* 23: 111-117
8. Lion T (2014). Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* 27: 441-462
9. Miller DL *et al.* (2006). Adenovirus type 5 exerts genome-wide control over cellular programs governing proliferation, quiescence, and survival. *Genome Biology* 8: R58
10. Dicks MDJ *et al.* (2012). A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity. *PLoS ONE* 7:1-12
11. Wevers D *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. Xiang Z *et al.* (2006). Chimpanzee adenovirus antibodies in humans, Sub-Saharan Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 1596-1599

13. Ersching J *et al.* (2010). Neutralizing antibodies to human and simian adenoviruses in humans and New-World monkeys. *Virology* 407: 1-6
14. De Santis O *et al.*(2016). Safety and immunogenicity of a chimpanzee adenovirus-vectored Ebola vaccine in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding, phase 1/2a study. *Lancet Infect. Dis.* 16: 311-320
15. Tapia MD *et al.* (2016). Use of ChAd3-EBO-Z Ebola virus vaccine in Malian and US adults, and boosting of Malian adults with MVA-BN-Filo: a phase 1, single-blind, randomised trial, a phase 1b, open-label and double-blind, dose-escalation trial, and a nested, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 16: 31-42
16. Knipe DM & Howley PM (2001). *Fields virology*, volume one, fourth edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
17. COGEM (2014). Inventarisatie van strikt dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/141216-02
18. COGEM (2012). Experimenten met onbekende adenovirussen uit mensapen. COGEM advies CGM/121210-01
19. COGEM (2013). Classificatie van elf adenovirus serotypen. COGEM advies CGM/130606-01
20. COGEM (2015). Classificatie van vier primate adenovirussen. COGEM advies CGM/150615-01