

Advies betreffende: **Genereren van replicatie competente en replicatie defectieve recombinant adenovirus vectoren**

Kennisgever: **Crucell Holland B.V.**

COGEM kenmerk  
**CGM/010606-04**

BGGO nummer  
**GGO 96-096/7**

Datum advies  
**6 juni 2001**

## **Inleiding**

Ten behoeve van immuniteitsstudies wil de aanvrager replicatie-deficiënte recombinant adenovirale vectoren genereren die structurele eiwitten van het Ebola virus tot expressie brengen.

Voor de constructie van de vectoren wil de aanvrager gebruik maken van een tweetal vector typen: vectoren afgeleid van Ad 5 (adenovirus serotype 5), en vectoren afgeleid van Ad5.Fib35 waarbij de fiber van Ad5 is vervangen door een fiber van adenovirus serotype 35. Bij het laatste type is sprake van een verhoogde transductie-efficiëntie van antigeen-presenterende cellen.

Met behulp van deze vectoren wil de aanvrager cDNA's tot expressie brengen, die coderen voor verschillende eiwitten afkomstig van verschillende Ebola isolaten. Het gaat om eiwitten met de functie van encapsidatie, polymerase cofactor, matrix eiwit, receptor-binding en fusie bij de binnenkomst in de cel.

De cDNA's zullen worden gekloneerd in pAdapt transferplasmides. Deze bevatten de 5' adenovirale sequenties de 5' ITR (inverted terminal repeat) en packaging sequenties. De recombinant adenovirale vectoren worden uiteindelijk gegenereerd middels homologe recombinatie. Hiertoe vindt cotransfectie plaats in de productieceldlijn PER.C6 (Ad5 E1A- en E1B eiwit complementierend) van de recombinante pAdapt transferplasmides met een cosmide die het completerende 3' gedeelte van het adenovirale genoom bevat. Op deze wijze zal voor elk cDNA een tweetal adenovirale vectoren worden gegenereerd (Ad5 en Ad.5Fib35). De uiteindelijke vaccinatie experimenten zullen in de Verenigde Staten uitgevoerd worden. Om deze reden beperkt het huidige advies zich tot de laboratorium handelingen zoals beschreven in de aanvraag.

## **Overweging en Inschaling**

Op grond van de door de aanvragers geleverde informatie kan de vorming van replicatie competent virus niet uitgesloten worden. Het gebruik van pAdapt in combinatie met PER.C6 voor de productie van adenovirale vectoren zou op basis van de pathogeniteitsklasse van de donor, Ebola- (klasse 4) en de gastheer, Adeno (klasse 2) leiden tot een inschaling op C-II niveau (5.5.6.h)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze regeling (1998)

Het gebruik van individuele donorsequenties afkomstig van virussen behorend tot klasse 3 of hoger kan de adequaatheid van de inschaling beïnvloeden. Betreffende de te gebruiken Ebola genen afkomstig van een virus klasse 4 heeft de COGEM dergelijke overwegingen gemaakt.

Aangezien adenovirussen geen membraan bevatten is het niet waarschijnlijk dat het Ebola GP eiwit in dit systeem de uiteindelijke compositie en de daarmee de biologische eigenschappen (virulentie en pathogeniteit) van de te genereren virale vector zal beïnvloeden. Daarnaast zijn beide virussen afkomstig uit niet-verwante virusfamilies. Ebolavirus is een Filovirus, een negatief-strengig RNA virus, adenovirus is een dubbelstrengs DNA virus. De organisatieprincipes van het virion (respectievelijk icosaeëdrisch en helicoïdaal) en de wijze van herkenning van encapsidatiesignalen zijn verschillend, hetgeen de inbouw van Ebola matrix of capsid eiwitten en daarmee het ontstaan van chimere virusdeeltjes van de vector, met veranderde biologische eigenschappen, niet erg waarschijnlijk maakt.

Op basis van de hierboven beschreven overwegingen acht de COGEM de veiligheid voor mens en milieu voldoende gewaarborgd bij een inschaling op C-I niveau. Aanvullend acht de COGEM het wenselijk dat geen handelingen met wild type adenovirussen of replicatie competente adenovirus bevattende vector stocks worden uitgevoerd in dezelfde ruimte gedurende de periode dat de nu aangemelde vectoren worden gegenereerd en/of geproduceerd. Hiermee wordt het risico van accidentele contaminatie met replicatie competent adenovirus verkleind.

## **Signalering**

Naar aanleiding van de onderhavige aanvraag zal de COGEM zich beraden of een algemene richtlijn opgesteld kan worden met betrekking tot de inschaling van adenovirale systemen in combinatie met donorsequenties welke afkomstig zijn van virussen van klasse 3 of 4. De COGEM zal daarbij nagaan in hoeverre daarbij gebruik gemaakt kan worden van de resultaten van het onderzoek van Van Haren en Spaan, zoals die zijn vastgelegd in het rapport 'Methodiek ter beoordeling van virale sequenties'<sup>2</sup>.

Zolang dit beraad nog niet heeft geleid tot een algemene richtlijn, acht de COGEM het wenselijk dat zij wordt geraadpleegd bij elke individuele aanvraag waarbij sprake is van virale vectorsystemen in combinatie met donorsequenties afkomstig van virussen van klasse 3 of 4.

---

<sup>2</sup> van Haren, W., Methodiek ter Beoordeling van Virale Sequenties, 2001, Rapportage uitgevoerd in opdracht van het het Ministerie van VROM, op voordracht van de Commissie Genetische Modificatie (COGEM)