

Advies betreffende: **Genetische modificatie van enkel-strengs RNA virussen met behulp van infectieuze cDNA methodieken**

Kennisgever: **Intervet International B.V.**

COGEM kenmerk
CGM/020318-06

BGGO nummer
GGO 98-115/2

Datum advies
18 maart 2002

Inleiding

Doelstelling van het onderzoek is de ontwikkeling van veterinaire vaccins middels genetische modificatie van enkelstrengs RNA virussen. De te gebruiken virussen behoren tot de ateri-, paramyxo- of rhabdovirussen. De voorgenomen werkzaamheden hebben betrekking op de genetische modificatie van het Rabies virus (RV) (Rhabdovirus) en het Newcastle disease virus (NDV) (Paramyxovirus). Beide virussen zijn negatief-strengige RNA virussen met envelop. Infectieus virus kan worden "gerecovered" na co-transfectie van plasmiden coderend voor de eiwitten N, P, L voor het Rabies virus of NP, P en L voor het Newcastle Disease Virus.

Beschrijving van het experiment

Full-lenght genomen van de betreffende virussen worden gekloneerd in plasmiden. Vervolgens worden puntmutaties, deleties en inserties van homologe/heterologe genen en markergenen zoals CAT en GFP aangebracht. Na transcriptie in zoogdiercellen worden de recombinant virussen opgekweekt in vertebrate celkweeksystemen. Vervolgens worden de recombinant virussen in dierexperimenten getest. De beoogde modificaties worden weergegeven in de tabel 1

Rabies Virus Newcastle Disease Virus

- Deleties in het P-eiwit van 7-10 aminozuren
- Deletie van het pseudogen
- Substitutie van aminozuursequenties
- Insertie van een additioneel Glycoproteïne (G) eiwit
- Insertie van cytokine genen (IL-12 en IFN-g)
- Deletie van aminozuursequenties (tot 20 aa)
- Additie van homologie F of HN genen
- Substitutie van immunogene epitopen (~20 aa afkomstig van niet-gerelateerde virussen
- Insertie van immunogene genen afkomstig van niet-gerelateerde virussen
- Insertie van een cytokine gen (IL-2)

Tabel 1: beoogde modificaties van het Rabies virus en het Newcastle Disease Virus

Overwegingen en advies

Het Rabies virus en het Newcastle disease virus behoren tot respectievelijk pathogeniteitsklasse 3 en 2. De te gebruiken vaccinstam van het Rabies virus kan als klasse 2 worden beschouwd. De aanvragers maken voor de oudervirussen gebruik van de stabiele goed gedocumenteerde vaccinstam SAD B19 van het Rabies virus en de lentogene vaccin stam Clone-30 van het Newcastle Disease Virus (NDV). Het gastheerbereik van beide virussen wordt primair bepaald door de envelop-eiwitten namelijk het Glycoproteïne (G) eiwit voor het Rabies virus en het hemagglutinine (HN) en fusie (F) eiwit van het Newcastle disease virus. Transmissie voor Paramyxovirussen vindt in het algemeen plaats via de lucht. Verspreiding van het Rabies virus verloopt in het bijzonder via honden en vossen waarbij besmetting via een beet op kan treden.

Genetische modificatie van het Rabies Virus en het Newcastle Disease Virus, klonering in E.coli

In de door de aanvrager beschreven experimenten is sprake van de vervaardiging van een ggo in een erkend gastheer / vector systeem waarbij gekarakteriseerde donorsequenties worden gebruikt. De sequentie bevat genetische informatie voor de vorming van een voor eukaryote cellen infectieus virus van klasse 2. Ten aanzien van de voorgestelde klonering in E.coli acht de COGEM een inschaling op VMT niveau toereikend.

Transfectie van zoogdiercellen en handelingen van cellen en weefsels uit geïnfecteerde proefdieren

Het is niet de verwachting dat de beschreven genetische modificatie effect zal hebben op het gastheerbereik van beide virussen. De aanvragers geven aan genetisch gemodificeerde virussen te vervaardigen die cytokinen (IL-2, IL-12 en g-IFN) tot expressie brengen die de immuunrespons versterken. De biologische functie van de genoemde cytokinen zijn pleiotroop en in het algemeen immunostimulatoir / immuunmodulerend.

De aanvragers verwachten een verdere afname van de virulentie en de pathogeniteit en een versterkte attenuering van de genetisch gemodificeerde virussen. De COGEM acht de door de aanvragers gevolgde redenering plausibel echter deze aannames worden niet bevestigd middels dierexperimentele gegevens.

Opgemerkt moet worden dat alle te genereren genetisch gemodificeerde virussen beschouwd worden als pathogeen daar zij replicatiecompetent zijn en nog steeds in staat zijn te verspreiden. Derhalve dienen de genetisch gemodificeerde virussen als volledig virulente virussen van pathogeniteitsklasse 2 ingeschaald te worden.

Op basis van de beschikbare gegevens adviseert de COGEM om transfectie van zoogdiercellen (productie van gemodificeerde viruspartikels) en handelingen met cellen en weefsels uit de met de ggo's geïnfecteerde cellen en weefsels uit te voeren op C-I niveau in combinatie met de volgende aanvullende voorschriften:

- Alle handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse-II uitgevoerd te worden,
- Tijdens de handelingen dienen handschoenen gedragen te worden.

Handelingen met proefdieren in associatie met genetisch gemodificeerde virussen

Met betrekking tot de handelingen met proefdieren (alleen muis en kip) in associatie met genetisch gemodificeerde virussen acht de COGEM een inschaling op D-II niveau noodzakelijk. Daar de verspreidingsroute van de te modificeren virussen via de lucht kan verlopen dient huisvesting plaats te vinden in filtertopkooien. Hierbij dienen de onderstaande aanvullende voorschriften te worden opgevolgd.

- De kooien dienen in een klasse II veiligheidskabinet geopend te worden en dienen uitwendig ontsmet te worden, voordat ze uit het veiligheidskabinet verwijderd worden.
- Tijdens de handelingen moeten handschoenen worden gedragen.

Opgemerkt moet worden dat recent enkele andere huisvestingsalternatieven ontwikkeld zijn, de COGEM zal deze op korte termijn inventariseren.