

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

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

COGEM kenmerk
CGM/020823-08

BGGO nummer
BGGO 02-030/1

Datum advies
3 september 2002

Inleiding

Ten behoeve van immuniteitsstudies wil de aanvrager replicatie-deficiënte recombinant adenovirale vectoren genereren die structurele eiwitten van het Marburg virus en het Lassa virus tot expressie brengen. Het Marburg virus behoort, net als het Ebola virus, tot de Filovirussen, welke vaak dodelijke (22 tot 88%) hemorragische koortsen veroorzaken, waarbij bloedingen het meest opvallende symptoom is. Filovirussen zijn negatief-strenging RNA virussen met een lipide membraan, waarvan de twee typen, Marburg en Ebola, serologisch en biochemisch verschillend zijn. Het Marburg virus is voor het eerst geïsoleerd tijdens een uitbraak in Europa in 1967. De belangrijkste besmettingsroute is van persoon op persoon door intiem contact, maar kan ook optreden door direct contact met besmet materiaal of via druppels en kleine aërosolen van besmette personen. Het Lassa virus behoort tot de Arenavirussen, welke membraan-bevattende negatief-strenging RNA virussen met een gesegmenteerd genoom zijn. Ze veroorzaken chronische infecties in knaagdieren, die kunnen leiden tot overdracht naar mensen door middel van contaminatie met besmet materiaal of via aërosolen. Evenals het Marburg virus veroorzaakt het Lassa virus vaak hemorragische koortsen (Lassa koorts).

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 Ad35 (adenovirus serotype 35). Bij het laatste type wordt een verminderde gevoeligheid voor neutraliserende werking van humaan serum en een verhoogde transductie-efficiëntie van antigeen-presenterende cellen verondersteld. Met behulp van deze vectoren wil de aanvrager cDNA's tot expressie brengen die coderen voor respectievelijk het GP glycoproteïne (transmembraan glycoproteïne, functie: receptor-binding en fusie van virus met gastheercel) van het Marburg virus, en het GP glycoproteïne (transmembraan glycoproteïne, functie: receptor-binding) van het Lassa virus (Arenavirus). De cDNA's zullen worden gekloneerd in pAdapt en pAdapt535 transferplasmides. Deze bevatten het linker gedeelte van het ITR (inverted terminal repeat) van het adenovirale genoom en de packaging sequenties. De recombinant adenovirale vectoren worden uiteindelijk gegenereerd middels homologe recombinatie. Hiertoe vindt voor pAdapt en pAdapt535 cotransfectie plaats in respectievelijk de productiecellijnen PER.C6 (Ad5 E1A- en E1B eiwit complementierend) en PER.55K (Ad E1B-55K eiwit complementierend) met een cosmide die het complementerende rechter gedeelte van het adenovirale genoom bevat. Op deze wijze zal voor elk cDNA een tweetal adenovirale vectoren worden gegenereerd (Ad5 en Ad.35). 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

Het kloneren in *E. coli* van individuele genen coderend voor GP eiwitten van het Marburg virus en het Lassa virus leidt volgens de Regeling op basis van de pathogeniteitsklasse 4 van de donorvirussen tot een C-I inschaling (1). Voor de productie van de recombinant adenovirale partikels in zoogdiercellen zou het gebruik van pAdapt in combinatie met PER.C6 en pAdapt535 in combinatie met Per.55K voor de op basis van de pathogeniteitsklasse van de donoren, het Marburg virus en het Lassa virus (beide klasse 4) en de adenovirale vector (klasse 2) als gastheer, volgend de regeling leiden tot een inschaling op C-II niveau (1).

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

De COGEM is van mening dat voor de uit te voeren werkzaamheden de gebruikte donorsequenties in biologische zin niet als schadelijk of als risicoverhogend zijn te kenmerken. Aangezien adenovirussen geen membraan bevatten is het niet waarschijnlijk dat het Marburg en het Lassa GP eiwit tijdens het productieproces de uiteindelijke compositie en daarmee de biologische eigenschappen (virulentie en pathogeniteit) van de te genereren virale vector zal beïnvloeden. Daarnaast zijn beide virussen afkomstig uit niet-verwante virusfamilies. Het Marburg virus en het Lassa virus zijn negatief-strengige RNA virussen, terwijl adenovirus een dubbelstrengs DNA virus is. De organisatieprincipes van het virion (respectievelijk icosaeëdrisch en helicoïdaal) en de wijze van herkenning van encapsidatiesignalen zijn verschillend. Hierdoor is het zeer onwaarschijnlijk dat chimere virale vectordeeltjes met veranderde biologische eigenschappen zullen ontstaan als gevolg van de inbouw van envelope eiwitten van het Marburg of het Lassa virus in de adenovirale vector.

Voor de productie van adenovirale vectoren met structurele eiwitten van Ebola virus van dezelfde aanvrager heeft de COGEM al eerder positief geadviseerd over de inschalingsvoorstellen van Bureau GGO (CGM/010606-04). Op basis van de hierboven beschreven overwegingen en het eerdere advies van de COGEM, acht de COGEM de veiligheid voor mens en milieu voldoende gewaarborgd bij een inschaling op VMT niveau voor de kloneringswerkzaamheden. Voor de productie van recombinante adenovirussen in zoogdiercellen kan de COGEM instemmen met een inschaling van de werkzaamheden op C-I niveau, waarbij als aanvullend voorschrift wordt gehanteerd dat gedurende het productieproces van de genoemde vectoren in dezelfde ruimte geen handelingen met wildtype adenovirussen of replicatie-competente adenovirus bevattende vector stocks worden verricht. Nogmaals dient opgemerkt te worden dat de uiteindelijke vaccinatie experimenten in de Verenigde Staten uitgevoerd worden.

1. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze Regeling (1998).