



Advies betreffende: **Adenovirale vectoren in apen**

COGEM kenmerk  
**CGM/021216-03**

BGGO nummer

Datum advies  
**16 december 2002**

## **Samenvatting**

Adenovirussen komen van nature voor in rhesusapen en chimpansees en bezitten de eigenschap om latent in organismen aanwezig te blijven. Door het gebruik van adenovirale vectoren in apen kunnen er risico's ontstaan met betrekking tot reactivatie, mobilisatie en uiteindelijk verspreiding in het milieu. Gezien deze problematiek brengt de COGEM advies uit over mogelijke implicaties op de risico-analyse van de toepassing van adenovirale vectoren in apen.

De COGEM is van mening dat de risico's voor mens en milieu betreffende het gebruik van adenovirale vectoren in rhesusapen en chimpansees verwaarloosbaar klein zijn, mits inperkende maatregelen in acht worden genomen zoals het monitoren op uitscheiding van adenovirussen. Nadat met behulp van een gevalideerde detectiemethode (PCR) aangetoond is dat er geen virusuitscheiding meer optreedt, is het terugplaatsen van de adenovirale geïnfecteerde apen naar een lager inschalingsniveau aanvaardbaar. Tevens signaleert de COGEM dat het hier experimenten betreft die ethische en maatschappelijke vragen oproepen. De COGEM pleit ervoor om de overwegingen die ten grondslag liggen aan de door de Dierexperimentencommissie te maken keuzen openbaar te maken.

## Inhoudsopgave

<b>1. Inleiding</b>	<b>2</b>
<b>2. Adenovirussen</b>	<b>3</b>
2.1 Introductie	3
2.2 Symptomen	3
2.3 Structuur	3
2.4 Infectie	4
2.5 Replicatiecyclus	4
<b>3. Adenovirale vectoren</b>	<b>5</b>
3.1 Algemeen	5
3.2 Vectorconstructen	5
3.3 Toepassingen	5
<b>4. Adenovirussen en apen</b>	<b>7</b>
<b>5. Potentiële risico's</b>	<b>8</b>
5.1 Detectiemethoden	8
5.2 Replicatie-competente adenovirussen	8
5.3 Reactivatie van latente adenovirussen	8
5.4 Uitscheiding in het milieu	9
<b>6. Overwegingen</b>	<b>11</b>
6.1 Biodistributie van adenovirussen	11
6.2 Reactivatie en mobilisatie	11
6.3 Uitscheiding en verspreiding	12
6.4 Risico-scenario's	13
<b>7. Advies en conclusies</b>	<b>14</b>
<b>8. Signalering</b>	<b>16</b>
8.1 Samenvatting	16
8.2 Signalering	16
<b>9. Referenties</b>	<b>18</b>

## 1. Inleiding

Experimenten met virale vectoren worden voor diverse doeleinden uitgevoerd, waaronder het ontwikkelen van nieuwe vaccins, toedienen van therapeutische genen, behandeling van kanker en andere ziekten. In zowel humane als dierlijke studies worden diverse typen vectoren gebruikt, onder andere gebaseerd op vacciniavirus, adeno-associated virussen, toga-, herpes-, adeno-, retro- of lentivirussen. Adenovirussen zijn de meest gebruikte vectoren aangezien ze verscheidene karakteristieken hebben waardoor ze bij uitstek geschikt zijn voor *in vitro* en *in vivo* gentransfer (1; 2). Adenovirale vectoren worden niet alleen voor wetenschappelijk onderzoek gebruikt bij mensen, maar ook bij apen, waaronder rhesusapen, chimpansees en bavianen.

De COGEM heeft in het verleden diverse adviezen uitgebracht betreffende experimenten met adenovirale vectoren in associatie met rhesusapen en chimpansees (CGM/021202-01; CGM/021001-04; CGM/020906-03; CGM/020823-07; CGM/020513-03; CGM/010724-03; CGM/010606-04; CGM/010206-02). Recentelijk zijn een aantal nieuwe inzichten onder de aandacht van de COGEM gebracht met mogelijke implicaties op de risico-analyse van de toepassing van adenovirale vectoren in apen. Eén van de naar voren gebrachte punten was dat apen die geïnfecteerd zijn met adenovirale vectoren, waarschijnlijk altijd drager zullen blijven van deze sequenties. Dit zou betekenen dat geïnfecteerde apen nooit vrij zijn van adenovirus vectoren, ook al kunnen er met gevoelige methoden zoals polymerase chain reaction (PCR) geen adenovirale vectorsequenties aangetoond worden. Tevens is onder de aandacht van de COGEM gebracht dat het mogelijk niet uitgesloten is dat apen aan een adenovirale infectie lijden zonder dat deze gediagnosticeerd kan worden, aangezien er vele nog niet gekarakteriseerde adenovirussen endemisch voorkomen. Adenovirale vectoren kunnen gereactiveerd worden door co-infecterende adenovirussen. Bovenstaande zou kunnen betekenen dat terugplaatsing van geïnfecteerde apen bij niet-geïnfecteerde apen mogelijk leidt tot verspreiding van adenovirale vectoren naar andere apen in de kolonie.

Het bovenstaande heeft de COGEM doen besluiten om een algemeen advies uit te brengen over de problematiek en risico-analyse met betrekking tot de toepassing van adenovirale vectoren in apen. Aangezien in Nederland onderzoek wordt gedaan met slechts een beperkt aantal soorten apen, wordt in het onderhavige advies van de COGEM specifiek ingegaan op de risico-analyse van het gebruik van adenovirale vectoren in rhesusapen en chimpansees.

## 2. Adenovirussen

### 2.1 Introductie

In 1953 zijn adenovirussen voor het eerst geïsoleerd uit explantaten van amandelen van kinderen en militaire rekruten met koortsachtige symptomen. Adenovirussen komen in veel verschillende diersoorten voor, waaronder vogels en vele zoogdieren inclusief mensen en apen. Binnen de familie *Adenoviridae* onderscheidt men vier genera. Alle bij mens en apen gevonden adenovirussen, en ook de meeste adenovirussen van andere zoogdieren, behoren tot het genus *Mastadenovirus*. Dit genus verschilt op een aantal punten van de andere drie (*Aviadenovirus*, *Atadenovirus* en *Siadenovirus*) voor wat betreft grootte en opbouw van het genoom. Bij de mens zijn meer dan vijftig verschillende adenovirale serotypen bekend, bij apen ongeveer dertig. De serotypen worden gegroepeerd in subgroepen of subgenera, A t/m G. Deze indeling van subgroepen is gebaseerd op verschillende kenmerken, onder andere DNA-homologie. De serotypen zijn ingedeeld op basis van verschillen in het zogenaamde hexonantigeen (3; 4).

### 2.2 Symptomen

Adenovirussen zijn in staat een groot aantal diverse celtypen te infecteren. Adenovirussen kunnen als latente infecties van lever of lymfoïde organen voorkomen en op een later tijdstip kan reactivatie optreden (2; 5). De pathogeniteit van de meeste adenovirussen is relatief laag. De serotypen van subgroep A zijn echter potentieel oncogeen in knaagdieren. Voor adenovirale vectoren wordt meestal virus uit subgroep C, serotype 2 of 5 (Ad2 en Ad5), gebruikt. In mensen kunnen adenovirussen milde griepachtige symptomen veroorzaken. Daarnaast kunnen ook ziektebeelden optreden variërend van conjunctivitis, geslachtsziekten, meningitis, gastro-enteritis tot luchtwegaandoeningen. Sommige serotypen veroorzaken ernstige ziektes bij patiënten met immuunsuppressie zoals HIV-patiënten. De humane serotypen 2 en 5, waar de meeste gebruikte vectoren van afgeleid zijn, zijn endemisch. De helft van deze infecties verloopt symptomeloos, de rest met verschijnselen van een bovenste luchtweginfectie. Epidemieën komen vooral op plaatsen waar jongeren samenkomen die niet eerder aan infectie blootgesteld, zoals rekruten en kleuterschoolkinderen. In het algemeen hebben kinderen in hun eerste levensjaar reeds antilichamen tegen tenminste één serotype. Na hun 15e jaar hebben de meeste personen tegen meerdere serotypen antilichamen opgewekt (6).

### 2.3 Structuur

Adenovirussen zijn, evenals de adeno-associated virussen, DNA virussen zonder membraan met een diameter van 80-110 nanometer. De virusdeeltjes hebben een eenvoudige structuur bestaande uit manteleiwitten en een nucleocapside. Het genoom bestaat uit één lineair dubbelstrengs DNA molecuul met een grootte van ongeveer 36 kilobasen. Aan beide uiteinden van het genoom bevinden zich sequenties van zogenaamde “inverted terminal repeats” (ITR). Een viraal gecodeerd terminaal eiwit is covalent gebonden aan het 5' einde van elke DNA streng. Het virale genoom codeert voor zowel structurele als niet-structurele eiwitten welke essentieel zijn voor de levenscyclus van het adenovirus (3; 4).

## 2.4 Infectie

Adenovirussen worden overgedragen door contact tussen gastheren, zoals aanraking. Daarnaast vindt overdracht plaats via besmette faeces, voornamelijk via de faecaal-orale route, maar er is ook aerogene transmissie. Het virus kan goed gedetecteerd worden in urine, faeces, het ademhalingsstelsel en het maagdarmsstelsel (7; 8). Het infectiespectrum van adenovirussen is breed qua weefseltype en leeftijd van het geïnfecteerde individu (6). Bij het binnendringen van adenovirussen in de cel zijn twee aparte cellulaire receptoren betrokken. Een transmembraaneiwit op de gastheercel, genaamd Coxsackievirus en Adenovirus Receptor (CAR) en alphaVbeta3- of 5-integrine, zorgen voor de initiële binding met het adenovirus (9). Vervolgens vindt er internalisatie in de cel plaats in clathrine-coated vesicles. Ditzelfde eiwit zorgt ook voor het vrijlaten van het virus DNA uit de endosomen. Tenslotte wordt het naakte virale DNA naar de celkern getransporteerd waar vermeerdering van het virus plaatsvindt (3; 4).

## 2.5 Replicatiecyclus

Na binnenkomst in de celkern van het virale DNA worden de genen van het adenovirale genoom van de vroege regio (E1a en E1b) snel geactiveerd. Gedurende deze vroege fase van virale replicatie komen vier verschillende regio's van het genoom tot expressie (E1, E2, E3 en E4). Deze eiwitten zorgen voor de verdere transcriptieregulatie van de andere genen, waaronder genen van de late regio (L1, L2, L3, L4 en L5). Van E1a is bekend dat dit betrokken kan zijn bij het ontstaan van tumorcellen. E1b kan dit zelf weliswaar niet, maar werkt met E1a samen om cellen stabiel te transformeren. Het virale genoom wordt van beide DNA strengen afgelezen waarbij gebruik wordt gemaakt van transcriptiecomponenten van de gastheercel. Replicatie van het virale genoom vindt plaats in de celkern, evenals het assembleren van het nieuwe virus. Voor dit laatste proces bezit het genoom een specifiek signaal ( $\psi$ ) om het virus in te pakken. Uiteindelijk komen de viruspartikels vrij door het openbarsten van de gastheercel. Deze zogenaamde lytische cyclus is voor de subgroep C (Ad2 en Ad5) adenovirussen erg efficiënt en resulteert in ongeveer  $10^4$  viruspartikels per geïnfecteerde cel. De cyclus duurt ongeveer 32 tot 36 uur en vereist geen integratie van het virale DNA in het genoom van de gastheer (1; 3; 4).

### 3. Adenovirale vectoren

#### 3.1 Algemeen

Adenovirale vectoren zijn afgeleid van adenovirussen en bezitten een aantal aantrekkelijke eigenschappen waardoor ze geschikt zijn voor genoverdracht en gebruikt kunnen worden in genterapie studies (1; 2). Zo bezitten ze een grote diversiteit en komen in veel verschillende diersoorten voor. Adenovirale vectoren infecteren een groot aantal celtypen en geven een hoge mate van genoverdracht. Daarnaast kunnen adenovirale vectoren relatief grote stukken DNA (circa 2 kilobasen) herbergen en kunnen dit DNA inbrengen in niet-delende cellen.

#### 3.2 Vectorconstructen

In de loop der jaren zijn verschillende typen adenovirale vectoren geconstrueerd. Bepaalde delen van het virale genoom kunnen vervangen worden door vreemd DNA. Ten minste drie regio's komen hiervoor in aanmerking: een regio in E1 en E3, en een kort stuk tussen E4, en op het einde van het genoom met uitzondering van de ITR. In de eerste generatie adenovirale vectoren is alleen de E1 regio vervangen door vreemd DNA. Verwijdering van de E1 regio heeft ook tot gevolg dat de vector niet meer in staat is tot virale replicatie.

De huidige tweede en derde generatie adenovirale vectoren hebben deleties in de E1, E2, en E4 genen. Naast het feit dat de vector alleen nog kan infecteren en niet meer kan repliceren, is er ook een verminderde immuunrespons tegen de vector. Hierdoor hebben deze vectoren een verminderde toxiciteit en een langere genexpressie *in vivo* (1; 2).

Productie van replicatie-deficiënte adenovirale vectoren is afhankelijk van zogenaamde helpervirus cellijnen. Dit zijn cellijnen die getransformeerd zijn met adenovirus DNA-fragmenten en constitutief het E1 eiwit produceren. Op deze wijze complementeren de helpervirus cellijnen de productie van viruspartikels van E1 gedeleteerde adenovirale vectoren. Hoge titers van  $10^{11}$  viruspartikels per milliliter kunnen geproduceerd worden. Echter door recombinatie gebeurtenissen kunnen er replicatie-competente adenovirale vectoren (RCA) geproduceerd worden. Assays voor de detectie van RCA's zijn cruciaal om de risico's voor de toepassing van adenovirale vectoren in te perken. In nieuwe helpercellijnen is de kans op het ontstaan van RCA geminimaliseerd. Hoe meer deleties aangebracht zijn in de adenovirale vector des te kleiner is de kans op het ontstaan van RCA.

#### 3.3 Toepassing

Evenals adenovirussen dringen adenovirale vectoren door tot in de kern van een cel maar zorgen niet voor integratie in het genoom. Een studie in cellijnen heeft echter uitgewezen dat er op kleine schaal wel integratie in het genoom plaatsvindt (10). Bij intraveneuze inspuiting van adenovirale vectoren wordt 90% van de toegediende vector opgeruimd in de lever (11). Tevens ontstaat er een sterke immuunrespons gecombineerd met cytotoxische T lymfocyten en anti-adenovirale antilichamen (12; 13). Adenovirale vectoren komen onder andere tot expressie in lever, spieren

van het skelet, hart, hersenen, longen, alvleesklier en tumorweefsel (14). De resterende vectoren hopen zich vervolgens op in de lever en lymfoïde organen.

Adenovirale vectoren worden veel gebruikt in humane gentherapie studies (1; 2; 15), de basis hiervoor ligt in experimenten met proefdieren. Met name de resultaten van onderzoek bij apen vormen een belangrijke schakel voor de overstap naar de klinische toepassing.

#### 4. Adenovirussen en apen

Rhesusapen (*Macaca mulatta*) behoren tot de makaken welke deel uitmaken van de Oude Wereldapen. Deze apen worden het meest gebruikt voor biomedisch onderzoek. De van oorsprong uit Zuidoost Azië afkomstige rhesusapen hebben een complexe sociale structuur. Chimpansees zijn ook sociale dieren en komen voor in Westelijk Midden-Afrika. Chimpansees (*Pan troglodytes*) behoren ook tot de Oude Wereldapen maar staan evolutionair dicht bij de mens dan rhesusapen.

Adenovirussen komen zowel bij rhesusapen als chimpansees voor. Vijf van de subgroepen bevatten adenovirussen die apen kunnen infecteren (simian adenovirussen), zowel chimpansees (A, B, C en E) als andere apensoorten. Relatief veel is bekend over humane adenovirussen, dit in tegenstelling tot de adenovirussen bij rhesusapen en chimpansees. De replicatiecyclus en infectieroute van adenovirussen zijn echter vergelijkbaar met de humane situatie (16; 17). Met name onder chimpansees komen veel adenovirussen voor. Tevens bezitten chimpansees adenovirale sequenties welke vergelijkbaar zijn met de mens (17). Daarnaast is er ook een groep van ongeveer 11 simian adenovirussen die geen relatie hebben met humane virussen. De aanwezigheid van adenovirussen is mede gebaseerd op waarnemingen dat chimpansees een zeer hoge immuunreactiviteit (90% seropositiviteit) hebben tegen adenovirussen. Bij rhesusapen en mensen is dit veel lager, wat duidt op een beperktere blootstelling aan adenovirussen. Dat de prevalentie bij chimpansees groter is dan bij mensen is mede toe te schrijven aan de verspreidingsroute en het verschil in sociaal gedrag. Voor het onderzoek bij apen worden vooral adenovirale vectoren gebruikt van het serotype C welke tenminste een deletie bevatten in het E1 gen en eventueel in andere genen.



## 5. Potentiële risico's

### 5.1 Detectiemethoden

In rhesusapen zijn adenovirale vectoren toegediend in de orde van  $10^{11}$  viruspartikels per individu (CGM/020906-03; CGM/010724-03; 020823-07). De detectie van adenovirale vectoren vindt hoofdzakelijk plaats met behulp van de polymerase chain reaction (PCR). Serum en urine monsters zijn adequate substraten om de aanwezigheid van adenovirale vectoren aan te tonen. Detectie van één adenovirusdeeltje blijkt onder in de praktijkcondities niet realiseerbaar. Ten eerste staat bij dergelijke lage concentraties niet vast dat het monster dat onderzocht wordt ook daadwerkelijk virus bevat. Ten tweede wordt de detectiegrens van de PCR test ongunstig beïnvloed door de aanwezigheid van niet-adenovirale sequenties (18). Voor de detectielimiet van PCR testen in humane urine is aangetoond dat deze ligt rond de 0.1 tot 0.2 pfu/ml oftewel 10 adenovirale partikels per milliliter (7; 8). Voor wat betreft rhesusapen ligt de theoretische detectielimiet voor serum rond de  $10^4$  adenovirale partikels per milliliter (CGM/020906-03 en CGM/010724-03). Een dergelijke detectielimiet betekent dat er altijd adenovirale vectoren aanwezig kunnen zijn die niet aangetoond kunnen worden met behulp van de PCR methode. Echter, hierbij moet rekening gehouden worden met het feit dat met deze methode DNA sequenties aangetoond worden en dus ook adenovirale sequenties welke niet meer intact zijn en dus geen risico meer zullen vormen voor de omgeving.

### 5.2 Replicatie-competente adenovirussen

Replicatie-deficiënte adenovirale vectoren worden gebruikt voor het overbrengen van genen. Het is van belang voor de veiligheid van dergelijke systemen dat de gebruikte vector alleen kan infecteren en daarna niet meer kan repliceren. Hiertoe worden essentiële genen uit de vector verwijderd zoals het E1 gen. De productie van replicatie-deficiënte adenovirale vectoren is afhankelijk van zogenaamde helpervirus die constitutief het E1 eiwit produceert. Op deze manier complementeren deze helpervirus cellijnen de productie van viruspartikels van E1 deficiënte adenovirale vectoren welke niet meer in staat zijn om te repliceren. Door recombinatie gebeurtenissen kan het voorkomen dat er replicatie-competente adenovirale vectoren (RCA) geproduceerd worden. De detectielimiet voor het vaststellen van de vorming van RCA's ligt vaak in de orde van één RCA per  $10^{12}$  adenovirale partikels (CGM/020823-07). De kans op het ontstaan van RCA kan verder ingeperkt worden door nog meer delen van het adenovirale genoom te vervangen. De zogenaamde 'gutless' vectoren bezitten geen oorspronkelijke voor eiwit coderende genen meer van het adenovirus. De essentiële genen voor de productie van virus partikels worden hier geleverd door helpervirussen (2). Door het ontstaan van RCA's in te perken neemt het risico voor mens en milieu sterk af.

### 5.3 Reactivatie van latente adenovirussen

Na infectie zullen adenovirale vectoren voornamelijk ophopen in de lymfoïde organen en in de lever. Gedurende de eerste dagen na infectie wordt het overgrote deel afgebroken door de lever (11). Daarnaast ontstaat er een sterke immuunrespons tegen de vectoren en de met adenovirale-

vectoren getransduceerde cellen, waarbij cytotoxische T-lymfocyten en antilichamen een centrale rol spelen (12; 13; 16; 19). De productie van neutraliserende antilichamen wordt geïnitieerd als gevolg van de eiwitten van de virusdeeltjes. Bij een tweede infectie met adenovirale vectoren worden de virusdeeltjes direct geneutraliseerd. Mede doordat apen al eerder blootgesteld zijn aan adenovirussen, en dus antilichamen bezitten, is de halfwaardetijd van adenovirale vectoren kort (enkele uren). Om de stabiliteit en expressie van adenovirale vectoren te verhogen worden nieuwe adenovirale vectoren ontworpen waartegen het immuunsysteem nog geen adequate antilichamen heeft (17; 20-22). Ondanks de mechanismen om adenovirussen af te breken zullen dergelijke virussen altijd latent aanwezig blijven in het organisme.

Adenovirussen kunnen lang in het lichaam aanwezig blijven, waarbij het niet duidelijk is of er sprake is van een echte latentie of dat op een laag niveau replicatie plaatsvindt. Latente virussen kunnen door verschillende omstandigheden gereactiveerd worden. Een belangrijke oorzaak van reactivatie is een verminderde functie of suppressie van het immuunsysteem (23). Activatie van latente adenovirussen is voornamelijk waargenomen in immuungecompromitteerde patiënten die transplantaties hadden ondergaan of geïnfecteerd waren met HIV (24).

Onder laboratoriumcondities zijn adenovirale vectoren die het E1-gen missen in staat om in diverse cellijnen in beperkte mate te repliceren. Echter in muizen blijken replicatie-deficiënte adenovirale vectoren hiertoe niet in staat te zijn (25). Daarnaast kunnen, in de aanwezigheid van wildtype adenovirale vectoren, E1-gedeleteerde adenovirale vectoren in ratten (*Sigmodon hispidus*) gemobiliseerd worden. Deze reactivatie *in vivo* is echter zeer beperkt aangezien er geen verspreiding van de vector naar andere weefsels is waargenomen (5). Uit een recent onderzoek blijkt dat adenovirale vectoren van het subtype 5 (Ad5, subgroep C) *in vitro* gemobiliseerd kunnen worden door adenovirussen van subgroep A, B, C en E (26). Het is niet uit te sluiten dat apen aan een adenovirale infectie lijden zonder dat dit gediagnosticeerd kan worden, aangezien er vele nog niet gekarakteriseerde adenovirussen voorkomen. Onder bepaalde condities is reactivatie van latente adenovirussen niet uit te sluiten.

#### 5.4 Uitscheiding in het milieu

Geïnfecteerde dieren scheiden de vector, zeker in de eerste 72 uur, uit. Hierbij kunnen vooral aerosolen afkomstig van de geïnfecteerde dieren een bron van besmetting zijn. Adenovirale vectoren geïnfecteerde apen zullen de eerste weken na infectie adenovirale sequenties blijven uitscheiden. Na deze tijd vindt er nagenoeg geen uitscheiding meer plaats. (5; 7). De gebruikelijke adenovirale vectoren zijn echter replicatie-deficiënt, zodat bij eventuele uitscheiding en opname door een ander dier geen vermeerdering zal optreden, tenzij er recombinatie van de vector optreedt. De besmettingsroute van adenovirussen is via de faecaal-orale weg. Indien geïnfecteerde apen na een experiment zodanig gehuisvest worden dat ze in contact kunnen komen met andere soortgenoten en mensen, is het niet te voorkomen dat deze geïnfecteerde apen blootgesteld en mogelijk besmet worden met simian of humane adenovirussen. Een fundamenteel probleem hierbij is dat adenovirale vectoren in principe gemobiliseerd zouden kunnen worden door andere adenovirustypen. Deze mobilisatie kan ervoor zorgen dat de adenovirale vectoren door de

---

chimpansees uitgescheiden worden in het milieu. De kans op mobilisatie en verspreiding is gering, maar niet geheel uit te sluiten.

## 6. Overwegingen

### 6.1 Biodistributie van adenovirussen

Adenovirussen komen voor bij mensen, rhesusapen en chimpansees. Bij de mens zijn meer dan vijftig serotypen beschreven en bij apen meer dan dertig. De humane serotypen zijn onderverdeeld in de subgroepen A t/m G. Vijf van de subgroepen bevatten simian adenovirussen, zowel van chimpansees (A, B, C en E) als van andere apensoorten. Daarnaast zijn er ongeveer elf simian adenovirussen die geen relatie hebben met humane virussen. Chimpansees blijken sterk geïnfecteerd te zijn met adenovirussen en bezitten adenovirale sequenties vergelijkbaar met de mens, en dan met name van subgroep A (17). Rhesusapen en mensen hebben een veel beperktere blootstelling aan adenovirussen. De virusverspreiding onder apen vindt volgens dezelfde routes plaats als bij mensen, zoals faecaal-oraal, via de luchtwegen en door direct of indirect contact. Het feit dat bij apen adenovirussen voorkomen die behoren tot de humane subgroep, betekent niet dat regelmatig uitwisseling van virus tussen apen en mensen plaatsvindt. Ondanks de diversiteit en biodistributie van adenovirussen blijkt dat apen niet of nauwelijks permissief zijn voor humane adenovirussen (27). Daarbij zijn de contacten tussen apen en mensen minder intensief dan tussen mensen onderling. Op basis hiervan is de COGEM van mening dat de kans op uitwisseling van adenovirussen tussen apen en mensen klein is. In het geval van uitwisseling van adenovirussen tussen apen en mensen zal er weinig kruisreactiviteit tussen de typen adenovirussen optreden (27-29). In een sommige gevallen zijn er host-range mutaties beschreven die humane adenovirussen in staat stelt in apencellen te repliceren (17; 30). De mechanismen achter deze mutaties zijn niet bekend.

Apengroepen vormen min of meer gesloten gemeenschappen, waardoor de introductie van virus afkomstig van andere apen buiten de gemeenschap slechts sporadisch zal voorkomen. Overdracht van virussen tussen nauw verwante apensoorten zal echter eerder optreden dan tussen apen en mensen.

### 6.2 Reactivatie en mobilisatie

Gezien het feit dat adenovirussen aanwezig zijn in apen, kan de introductie van adenovirale vectoren zorgen voor reactivatie en mobilisatie van adenovirussen. Een aantal studies heeft aangetoond dat adenovirale vectoren gemobiliseerd kunnen worden door adenovirussen (5; 26; 31). Humane replicatie-deficiënte adenovirale vectoren (bijvoorbeeld Ad5) zouden door simian adenovirussen gemobiliseerd kunnen worden in apen (hoewel niet efficiënt). De humane Ad2 en Ad5 vectoren behoren beide tot de subgroep C en de enige bekende simianvirussen binnen deze subgroep zijn SAdV-13 en de chimpansee adenovirus C2.

Mobilisatie van een replicatie-deficiënte vector door een trans-complementerend adenovirus is dus in principe mogelijk, maar *in vivo* studies hebben aangetoond dat er nauwelijks of geen disseminatie vanaf de plaats van toediening (neus) naar de trachea en geen disseminatie naar de longen plaatsvindt (5). Tevens is er geen uitscheiding via de faeces aangetoond (15). In deze

experimenten zijn de vector en het helpervirus op dezelfde plaats toegediend, waarbij ruim zeven keer meer helpervirus toegepast werd dan vector. Deze gegevens tonen aan dat de kans op verspreiding ten gevolge van mobilisatie door complementatie uiterst klein is, zeker wanneer we de faecaal-orale besmettingsroute als meest voor de hand liggende route voor adenovirus transmissie in ogenschouw nemen. Daarnaast kan complementatie alleen optreden wanneer RCA- en vector DNA dezelfde celkern infecteren. De kans hierop is het grootst wanneer beide in hoge concentratie aanwezig zijn. Dit is alleen het geval wanneer het proefdier juist ten tijde van de toediening van de adenovirale vector een acute infectie doormaakt van het orgaansysteem waarin de vector wordt toegediend, bijvoorbeeld in de luchtwegen bij cystic fibrosis-therapie. Is de acute fase voorbij, dan is de trefkans vele malen lager. Vele niet-geïnfecteerde cellen beconcurreren de weinige vector geïnfecteerde cellen en de replicatie-deficiënte vector krijgt maar één kans tot complementatie. Als er weinig virusdeeltjes zijn is de kans op een effectieve recombinatie lager. De COGEM is dan ook van mening dat de kans op verspreiding van replicatie-deficiënte adenovirusvectoren als gevolg van reactivatie en/of mobilisatie (complementatie) door endogene adenovirussen uiterst gering is.

### 6.3 Uitscheiding en verspreiding

Indien als gevolg van de infectie met adenovirussen reactivatie optreedt, dan bestaat een kans op uitscheiding ('shedding') van adenovirale vectoren. De kans op shedding hangt sterk af van de condities, zoals de plaats van virusreplicatie, hoeveelheid vector en intensiteit van de viremie met het simian adenovirus. De kans op shedding is hoog wanneer de recombinatie plaatsvindt in een systeem in open communicatie met de buitenwereld, zoals darm of luchtwegen. In de lever geproduceerd virus kan via de darm naar buiten. Bij een inwendige reactivatie, zoals in de hartspeer, is de kans op shedding klein, aangezien waarschijnlijk binding zal optreden van het gereactiveerde virus aan een cel tijdens het verblijf in het lichaam. Daarnaast is tijdens de eerste infectie het immuunsysteem sterk geactiveerd. De inductie van een immuunrespons tegen adenovirus vermindert de persistentie en de verspreiding van het virus sterk.

Indien toch shedding optreedt zal de fitness van het adenovirus minimaal zijn, aangezien de vector afhankelijk is van zijn wildtype helpervirus. Een replicatie-deficiënte vector kan in tegenstelling tot wildtype adenovirus geen normale cel infecteren, maar is afhankelijk voor replicatie van een met het juiste virus geïnfecteerde cel. Echter, indien het onwaarschijnlijke geval van recombinatie optreedt, kan dit resulteren in een verhoogde fitness. Maar ook in dit laatste geval zal de fitness van de recombinant vermoedelijk aanzienlijk lager zijn dan die van wildtype adenovirus. Een infectieus virus met een insertie van zo'n 2 kilobasen heeft een verminderde fitness en zal vermoedelijk afgebroken worden of zijn insertie verliezen. Op basis van deze gegevens acht de COGEM de risico's voor de omgeving zeer gering, maar wel enigermate afhankelijk van de gebruikte insertie. Bij de risico-analyse moet wel in ogenschouw genomen worden of de insertie tot een verhoogd risico kan leiden, zoals oncogenen, immuunsuppressiva en toxines.

#### 6.4 Risico-scenario's

Samenvattend kunnen als gevolg van experimenten met adenovirale vectoren geïnfecteerde apen twee scenario's optreden. Ten eerste, uitscheiding van een nog aanwezige vector. Ten tweede, reactivatie met aansluitend een mogelijkheid van vector uitscheiding en eventueel RCA vorming met een insertie van maximaal 2 kilobasen.

*Eerste scenario.* De vector is al enige tijd niet meer aantoonbaar met behulp van een PCR test met één detectielimiet van één pfu. De uitscheiding zal derhalve zeer gering zijn. De kans dat een dergelijke geringe hoeveelheid vector een gevoelige cel bereikt is zeer klein. Gezien het feit dat ook van wildtype virus dat in zeer grote hoeveelheden wordt uitgescheiden, maar een zeer kleine fractie zijn doel bereikt. In het geval van een replicatie-deficiënte adenovirale vector betreft het niet een gevoelige cel, maar om een gevoelige cel met een co-infectie met een adenovirus van de juiste subgroep. Voor het gebruik van de Ad2 en Ad5 adenovirale vectoren is dit subgroep C. De COGEM acht de kans op dit scenario, gezien het bovenstaande, en mede gezien het feit dat er slechts twee subgroep C simian adenovirussen bekend zijn, verwaarloosbaar klein.

*Tweede scenario.* Voor het ontstaan van RCA's is een zeer hoge mate van infectie nodig. Infectie door een humaan type C virus is niet waarschijnlijk aangezien apen nauwelijks permissief zijn voor humane adenovirussen. Daarbij zijn dergelijke proeven gedaan met massale dosis virus. Van subgroep C zijn er maar twee simian adenovirussen bekend, waarvan één bij chimpansees. Dat een dergelijk virus zou circuleren en actieve infecties veroorzaakt in een kleine gesloten groep apen is onwaarschijnlijk. Adenovirussen komen vooral voor in open gemeenschappen met veel contactmogelijkheden. Indien een infectie plaatsvindt betreft het een relatief klein deel van de permissieve cellen. De kans dat daaronder een cel met een co-infectie van vector zal zijn, is naar evenredigheid kleiner. Als in de populatie de laatste tijd een adenovirus actieve infecties heeft veroorzaakt, is te verwachten dat tenminste een deel van de populatie een immuniteit heeft opgebouwd. Gezien het bovenstaande acht de COGEM de kans op het ontstaan van verspreiding van RCA's verwaarloosbaar klein.

## 7. Advies en conclusies

Op basis van de bovengenoemde overwegingen is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu betreffende het gebruik van adenovirale vectoren in rhesusapen en chimpansees beheersbaar zijn. Gezien de rol van het immuunsysteem is het van belang dat de apen die geïnfecteerd zijn met een adenovirale vector een goed functionerend immuunsysteem moeten houden. Om de kans op vorming van RCA's te beperken is het noodzakelijk dat het proefdier te tijde van de toediening van de adenovirale vector géén acute infectie doormaakt van het orgaansysteem waarin de vector wordt toegediend. De COGEM adviseert om de apen vóór de proef te monitoren en de dieren één tot twee weken voor het experiment apart te huisvesten om het risico van een acute infectie te verkleinen. De incubatietijd van adenovirussen is ongeveer tien dagen. Daarbij adviseert de COGEM om adenovirale vectoren te gebruiken waarbij er een minimale kans is op complementering en vectormobilisatie.

De COGEM acht het monitoren op shedding van adenovirussen van groot belang. Het aantonen van virus in urine of in faeces met behulp van de PCR methode heeft de voorkeur boven testen van serum. De detectielimiet van PCR testen in humane urine ligt rond de 0.1 tot 0.2 pfu/ml, oftewel 10 adenovirale partikels per milliliter (7; 8). De eenheid pfu is meer informatief dan deeltjes, omdat het aantal deeltjes dat nodig is voor de vorming van één pfu in de orde van grootte van 11 tot 2300 ligt (33). Bij eerdere aanvragen en adviezen met betrekking tot rhesusapen is gebleken dat de theoretische detectielimiet voor serum rond de  $10^4$  adenovirale partikels per milliliter ligt (CGM/020906-03 en CGM/010724-03). Overigens is de COGEM van mening dat op grond van de beschikbare literatuurgegevens de gevoeligheid van de PCR methode voor serum mogelijk hoger kan zijn.

Indien met behulp van een gevalideerde PCR methode aangetoond is dat er geen virusuitscheiding meer optreedt, is het terugplaatsen van de adenovirale geïnfecteerde apen naar een lager inschalingsniveau aanvaardbaar. Treedt er nog wel shedding op dan dient de isolatie op D-II niveau gehandhaafd te blijven. Tevens acht de COGEM virologische monitoring van de kolonie wenselijk, zodat eventueel optredende shedding traceerbaar blijft. Dit is met name van belang indien de dieren een periode doormaken van verzwakking van het immuunsysteem. Daarnaast dient vermeden te worden dat de hele kolonie in contact komt met andere kolonies en toegezien worden dat slechts minimale dierverplaatsingen plaatsvinden. Andere soortgenoten kunnen wel in de kolonie worden toegelaten, maar mogen deze niet meer apart verlaten om eventuele transmissie van adenovirussen te beperken. Hierbij geldt het principe van het "all-in, all-out" systeem. Daarnaast mogen deze dieren niet meer gebruikt worden voor andere experimenten of voor fokdoeleinden. Bij de handelingen met de apen dienen de verzorgers handschoenen en maskers te dragen en geen onnodig fysiek contact te maken met de apen.

De COGEM is van mening dat met inachtneming van bovengenoemde inperkende maatregelen de risico's voor mens en milieu van het gebruik van adenovirale vectoren in associatie met apen

aanvaardbaar zijn. Voorts is de COGEM van mening dat de kans op het mobiliseren en shedden van de vector, en op horizontale overdracht naar andere apen en/of verzorgers, verwaarloosbaar klein is.

Tenslotte merkt de COGEM op dat adenovirale vectoren geconstrueerd kunnen worden middels diverse vectorsystemen en diverse deleties. Door het veelvoud van mogelijke vectoren met diverse DNA inserties zijn niet alle adenovirale vectoren vergelijkbaar. Dit algemeen advies gaat uit van adenovirale vectoren met inserties, welke geen bekend verhoogd risico met zich meedragen. Het advies dient als een richtsnoer om de case-by-case benadering te ondersteunen voor het geval inserties gebruikt worden die een verhoogd risico met zich meebrengen, zoals bijvoorbeeld oncogenen, immuunsuppressiva en toxines.



## 8. Signalering

### 8.1 Samenvatting

De COGEM signaleert dat het hier experimenten betreft die ethische en maatschappelijke vragen oproepen. De vereiste zorgvuldigheid houdt in dit verband o.a. in dat de toekomstperspectieven van apen die gebruikt zijn voor experimenten met adenovirale vectoren, alsmede de vraag welke beperkingen toelaatbaar zijn, bij de beoordeling van de onderzoeksprotocollen worden betrokken. De overwegingen die ten grondslag zullen liggen aan de door de betreffende Dierexperimentencommissie (DEC) te maken keuzen, zijn volgens de gangbare procedures niet altijd openbaar toegankelijk. Mede in het kader van het algemene overheidsbeleid om besluitvorming rond maatschappelijk gevoelige onderwerpen zo transparant mogelijk te maken (met uitzondering van informatie, die uit concurrentieoverwegingen vertrouwelijk dient te blijven), acht de COGEM het wenselijk om deze argumentaties in het vervolg wel openbaar te maken.

### 8.2 Signalering

De COGEM wil signaleren dat experimenten met apen, zeker als het chimpansees betreft, op grote schaal ethische en maatschappelijke vragen oproepen. In de signalering bij haar eerdere advies (CGM/021001-04) heeft de COGEM dit ook al aangegeven.

Over de noodzaak van het gebruik van apen als proefdier is de afgelopen jaren uitvoerig in de media en in het parlement gediscussieerd. Er bestaan sterke maatschappelijke en ethische weerstanden tegen het gebruik van primaten en van chimpansees in het bijzonder. Bij de discussie over de toelaatbaarheid van het gebruik van primaten voor biomedisch onderzoek wordt veelal een onderscheid gemaakt in onderzoek met chimpansees en onderzoek met kleinere niet-humane primaten.

Onderzoek aan chimpansees acht men op ethische gronden hoogstens toelaatbaar wanneer er zeer ernstig gevaar voor de volksgezondheid dreigt. Daarbij speelt enerzijds het respect voor de chimpansee als de meest nabij de mens staande diersoort, in fysiologisch en psychologisch opzicht, een belangrijke rol. Chimpansees zijn zich onmiskenbaar in hoge mate bewust van hun eigen situatie, hun gevangenschap en het ongerief dat een ernstige ziekte met zich meebrengt. Daarenboven wordt door activiteiten van de mens het natuurlijk leefmilieu van de chimpansee ernstig bedreigd. Anderzijds moet erkend worden dat, zolang er geen realistisch alternatief voorhanden is, juist deze vergaande gelijkenis de chimpansee tot het enige proefdier bestempelt, waarmee vaccins en therapieën kunnen worden getest voordat een experimenteel product op menselijke vrijwilligers wordt uitgetest. Dat betekent dat de beslissing in hoeverre chimpansees mogen worden gebruikt in biomedisch onderzoek zich onvermijdelijk afspeelt in een spanningsveld. Er moet een afweging gemaakt worden tussen twee onverzoenbare aanspraken; de verantwoordelijkheid ten aanzien van deze unieke en met uitsterven bedreigde dieren en de verantwoordelijkheid ten aanzien van onze medemens.

In het voorjaar van 2002 heeft het toenmalige kabinet een wetvoorstel tot een verbod op proeven met mensapen, o.a. chimpansees voor advies naar de Raad van State gestuurd. Het wetsvoorstel, dat op 26 augustus 2002 aan de Tweede Kamer is aangeboden, behelst een zodanige wijziging van de Wet op de dierproeven dat proeven op mensapen worden verboden. Er wordt slechts één uitzondering gemaakt, voor proeven met chimpansees ten behoeve van onderzoek naar een vaccin tegen hepatitis-C waarvan de uitvoering is begonnen vóór 1 januari 2003.

Bij kleinere apen wordt de grens niet zo streng getrokken. Er blijft sprake van een spanningsveld, zoals bij de mensapen. Doch de claim dat, zolang er geen realistische alternatieven bestaan, dierproeven noodzakelijk zijn in verband met onderzoek naar ernstige ziekten weegt zwaarder. Dat betekent dat er vooral wordt gestuurd op vervanging, vermindering en verfijning. De discussie over het gebruik van primaten in dierproeven is echter allerminst als afgesloten te beschouwen. Als uit verder onderzoek zou volgen dat voor apen die gebruikt zijn voor experimenten met adenovirale vectoren nadien geen verblijf op dierentuin-niveau te garanderen is, vermindert dat de aanvaardbaarheid van deze proeven aanmerkelijk. De COGEM wil er in dit verband ook op wijzen dat risicoperceptie voor een deel afhankelijk is van menselijke waarden. Bepaalde beperkingen en voorschriften zullen misschien de risico's in technische zin minimaliseren, maar kunnen daarbij wel de humane waarden van het betamelijke ten aanzien van de dieren overschrijden.

De argumentatie om de chimpansees uit te plaatsen, berust op de waarde die men in Nederland aan chimpansees hecht (zie boven). Om dezelfde redenen mag men bij beëindiging van een proef de chimpansees niet zondermeer afmaken. De onderzoeker moet, aldus het huidige beleid, de oudedagvoorziening van de chimpansee in de onderzoekeprijs meenemen. Deze redenering geldt niet alleen voor chimpansees, maar in principe ook voor andere primaten. Het dilemma dat nu ethisch dreigt te ontstaan is de afweging van enerzijds het besmettingsrisico voor andere apen of de mens en de daaruit voortkomende gezondheids- en welzijnsproblemen, en anderzijds het respectvol en humaan omgaan met deze apen, die immers als meest verwant aan de mens worden beschouwd.

Voorafgaand aan dierproeven dient in Nederland de betreffende Dierexperimentencommissie (DEC) positief te adviseren over het ingediende onderzoeksprotocol. De COGEM wil bepleiten dat bij deze toetsing de vooruitzichten van het proefdier op een acceptabele huisvesting na de experimenteerfase belangrijk meewegen.

Bovendien wil de COGEM, gezien de allerwegen gedeelde ethisch-maatschappelijke bedenkingen tegen dierproeven met primaten, wijzen op het grote belang van transparantie en openheid. De COGEM signaleert dat in de huidige procedure de argumenten en de oordeelsvorming door de DEC voor de burger niet voldoende openbaar beschikbaar zijn. Betere toegankelijkheid van de gemaakte keuzen en de achterliggende redenen acht de COGEM bij deze gecompliceerde problematiek in de toekomst wenselijk.

## 9. Referenties

1. Zhang, W. W. (99). *Cancer Gene Ther* **6**, blz. 113-38
2. Vorburger, S. A. and Hunt, K. K. (2002). *Oncologist* **7**, blz. 46-59
3. Flint, S. J. (2000). *Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis and Control*.
4. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses.
5. Imler, J. L., Bout, A., Dreyer, D., Dieterle, A., Schultz, H., Valerio, D., Mehtali, M., and Pavirani, A. (95). *Hum Gene Ther* **6**, blz. 711-21
6. Gentransfer mit Hilfe von Adenovirus Typ 5 (2001). Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit.
7. Echavarria, M., Forman, M., Ticehurst, J., Dumler, J. S., and Charache, P. (98). *J Clin Microbiol* **36**, blz. 3323-6.
8. Echavarria, M., Forman, M., van Tol, M. J., Vossen, J. M., Charache, P., and Kroes, A. C. (2001). *Lancet* **358**, blz. 384-5
9. Einfeld, D. A. and Roelvink, P. W. (2002). *Curr Opin Mol Ther* **4**, blz. 444-51
10. Harui, A., Suzuki, S., Kochanek, S., and Mitani, K. (99). *J Virol* **73**, blz. 6141-6
11. Worgall, S., Wolff, G., Falck-Pedersen, E., and Crystal, R. G. (97). *Hum Gene Ther* **8**, blz. 37-44
12. Yang, Y. and Wilson, J. M. (95). *J Immunol* **155**, blz. 2564-70
13. Gilgenkrantz, H., Duboc, D., Juillard, V., Couton, D., Pavirani, A., Guillet, J. G., Briand, P., and Kahn, A. (95). *Hum Gene Ther* **6**, blz. 1265-74
14. Bramson, J. L., Graham, F. L., and Gauldie, J. (95). *Curr Opin Biotechnol* **6**, blz. 590-5
15. Alemany, R., Balague, C., and Curiel, D. T. (2000). *Nat Biotechnol* **18**, blz. 723-7
16. Zoltick, P. W., Chirmule, N., Schnell, M. A., Gao, G. P., Hughes, J. V., and Wilson, J. M. (2001). *J Virol* **75**, blz. 5222-9
17. Farina, S. F., Gao, G. P., Xiang, Z. Q., Rux, J. J., Burnett, R. M., Alvira, M. R., Marsh, J., Ertl, H. C., and Wilson, J. M. (2001). *J Virol* **75**, blz. 11603-13
18. Zhang, W. W., Koch, P. E., and Roth, J. A. (95). *Biotechniques* **18**, blz. 444-7
19. Schnell, M. A., Zhang, Y., Tazelaar, J., Gao, G. P., Yu, Q. C., Qian, R., Chen, S. J., Varnavski, A. N., LeClair, C., Raper, S. E., and Wilson, J. M. (2001). *Mol Ther* **3**, blz. 708-22
20. Gao, G. P., Yang, Y., and Wilson, J. M. (96). *J Virol* **70**, blz. 8934-43

21. Chirmule, N., Raper, S. E., Burkly, L., Thomas, D., Tazelaar, J., Hughes, J. V., and Wilson, J. M. (2000). *J Virol* **74**, blz. 3345-52
22. Varnavski, A. N., Zhang, Y., Schnell, M., Tazelaar, J., Louboutin, J. P., Yu, Q. C., Bagg, A., Gao, G. P., and Wilson, J. M. (2002). *J Virol* **76**, blz. 5711-9
23. Smith, K., Brown, C. C., and Spindler, K. R. (98). *J Virol* **72**, blz. 5699-706
24. Hierholzer, J. C. (92). *Clin Microbiol Rev* **5**, blz. 262-74
25. Nelson, J. E. and Kay, M. A. (97). *J Virol* **71**, blz. 8902-7
26. Rademaker, H. J., Abou El Hassan, M. A., Versteeg, G. A., Rabelink, M. J., and Hoeben, R. C. (2002). *J Gen Virol* **83**, blz. 1311-4
27. Afione, S. A., Conrad, C. K., Kearns, W. G., Chundururu, S., Adams, R., Reynolds, T. C., Guggino, W. B., Cutting, G. R., Carter, B. J., and Flotte, T. R. (96). *J Virol* **70**, blz. 3235-41
28. Willimzik, H. F., Kalter, S. S., Lester, T. L., and Wigand, R. (81). *Intervirology* **15**, blz. 28-36
29. Wigand, R., Mauss, M., and Adrian, T. (89). *Intervirology* **30**, blz. 1-9
30. Opalka, B., Reith-Witowski, M., Kirch, H. C., and Holthausen, H. S. (94). *Intervirology* **37**, blz. 36-40
31. Zheng, B., Mittal, S. K., Graham, F. L., and Prevec, L. (94). *Virus Res* **31**, blz. 163-86
32. Horwitz. (90). *Field's Virology*. blz. 1685
33. Horzinek. (85). *Algemene Virologie*

Dit advies en signalering is mede tot stand gekomen dankzij de adviezen van:

J.M. Wilson, M.D., PhD. (University of Pennsylvania, USA)

Dr. A. van Belkum (Academisch Ziekenhuis Rotterdam, Afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten)

De leden van de COGEM subcommissie Medisch en Veterinair

De leden van de COGEM subcommissie Ethiek en Maatschappelijke Aspecten

### **Commissie Genetische Modificatie (COGEM)**

De COGEM heeft tot taak de Staatssecretaris van VROM op diens verzoek of uit eigen beweging te adviseren over de risico-aspecten van handelingen met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) en te signaleren over ethische en maatschappelijke aspecten van de toepassingen van ggo's. De taak van de COGEM is vastgelegd in de Wet Milieubeheer.