Commissie Genetische Modificatie

Advies betreffende: **Classificatie geattenueerde pokkenvirus-stammen en aanvullende voorschriften**

Kennisgever:

COGEM kenmerk	BGGO nummer	Datum advies
CGM/030519-06		**26 mei 2003**

Inleiding

Een veel gebruikt systeem om eiwitten tot expressie te brengen zijn vectoren die zijn afgeleid van het vacciniavirus. Het vacciniavirus behoort tot de *Poxviridae* en is een dubbelstrengs DNA virus. De familie van de *Poxviridae* wordt onderverdeeld in twee subfamilies, de *Chordopoxvirinae* en de *Entomopoxvirinae*. Het vacciniavirus behoort tot de subfamilie van de *Chordopoxvirinae*, waartoe 7 genera behoren waaronder orthopoxvirussen en avipoxvirussen. Het vacciniavirus is in eerste instantie gebruikt om te vaccineren tegen pokken. Recombinant vacciniavirussen worden echter ook toegepast in het laboratorium. Een van de voordelen van een vaccinia expressiesysteem is dat eiwitten in een biologisch actieve vorm en in een relatief grote hoeveelheid kunnen worden geproduceerd. Het gebruik van volvirulente vacciniavectoren is niet zonder risico's. Daarom is in de afgelopen jaren veel onderzoek gedaan om vacciniavectoren veiliger te maken door hun virulentie sterk te verminderen. Een van de manieren om vaccinia virussen te attenueren is door de virussen veelvuldige passages te laten doorgaan in cellijnen. Tevens kunnen virussen geattenueerd worden door specifieke genen te verwijderen. Ook kunnen virussen gebruikt worden die een kleiner gastheerbereik hebben dan wildtype vacciniavirussen. Tenslotte kan de virulentie verminderd door lymphokine genen in het virusgenoom in te brengen. Expressie van bijvoorbeeld IL-12 of interferon-γ zorgt voor een verminderde pathogeniteit van de virussen in vergelijking met wildtype vacciniavirussen (1).

Een van de meest geattenueerde vacciniastammen is de MVA stam. MVA behoort tot de orthopoxvirussen en is afgeleid van de 'Ankara' vacciniastam. MVA ('modified vaccinia virus Ankara') is ontstaan door meer dan 570 passages in kippenembryo fibroblasten. Hierdoor is MVA gastheerspecifiek geworden en is niet meer in staat om in mensen of andere zoogdieren te vermenigvuldigen. De defecten in het gastheerbereik zijn onder andere ontstaan als gevolg van deleties in het virale genoom van MVA (1; 5). De vacciniastam MVA is veelvuldig gebruikt voor vaccinatiestudies (2; 7). Ongeveer 120.000 mensen zijn reeds gevaccineerd tegen pokken met een MVA construct zonder dat daarbij incidenten optraden. Uit andere studies is gebleken dat zelfs in immuundeficiënte dieren MVA niet-pathogeen is (6).

Naast MVA zijn ook andere virussen sterk geattenueerd zoals NYVAC, ALVAC en TROVAC (3). NYVAC behoort tot de orthopoxvirussen en is afgeleid van een isolaat van de 'Copenhagen' vacciniastam. Door 18 specifieke gensequenties te verwijderen is de sterk geattenueerde NYVAC stam ontstaan (8). NYVAC is zeer slecht in staat om in

zoogdiercellen te repliceren. In tegenstelling tot MVA en NYVAC behoort ALVAC tot het genus *Avipoxvirus*. ALVAC is een geattenueerd kanariepokkenvirus. Het virus kan niet repliceren in zoogdieren, enkel in kanaries en vogels behorend tot de familie van de *Fringillidae*. ALVAC vectoren worden vaak toegepast in katten, honden en paarden (3; 9).
Een andere geattenueerd virus van de *Poxviridae* is TROVAC. Deze stam is gebaseerd op het sterk geattenueerde *fowlpox vaccine strain virus*. TROVAC behoort evenals ALVAC tot de avipoxvirussen welke niet in zoogdieren kunnen repliceren.

Zowel MVA, NYVAC, ALVAC en TROVAC zijn sterk geattenueerde virussen die vaak gebruikt worden voor toepassingen als recombinante vaccins in zowel humane als veterinaire situaties. Een vacciniastam die minder geattenueerd is, is de oude vaccinstam WR. De 'Western Reserve strain' (WR) behoort tot de orthopoxvirussen en wordt nog regelmatig gebruikt in onder andere vaccinatiestudies.

Vaccinia (*Poxviridae*) en de bijbehorende geattenueerde stammen worden ingedeeld als een pathogeniteitsklasse 2 virus volgens de Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (4). In het verleden is een aantal adviezen uitgebracht betreffende werkzaamheden met vacciniavectoren (CGM/960501-01, CGM011029-02 en CGM/020823-03). In een aantal beschikkingen (GGO 96-062/1, GGO 97-029, GGO 95-259/2 en GGO 02-085) zijn op basis van COGEM adviezen aanvullende voorschriften voorgeschreven voor het werken met de verschillende vacciniastammen. In het huidige advies herziet de COGEM de aanvullende voorschriften en pathogeniteitsklassen voor de diverse gangbare virusstammen WR, MVA, NYVAC, ALVAC en TROVAC.

Overwegingen en Advies

De virussen uit de familie *Poxviridae* waartoe het *Vaccinia virus* behoort worden beschouwd als pathogeniteitsklasse 2 of hoger. In de huidige Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (4) zijn dus ook de vacciniastammen WR, MVA, NYVAC, ALVAC en TROVAC ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. Virussen van pathogeniteitklasse 2 kunnen bij mensen een ziekte veroorzaken waarvan het waarschijnlijk is dat deze zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat. Micro-organismen van pathogeniteitsklasse 1 voldoen aan de volgende voorwaarden:
- Het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
- Of 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;
- Of van het micro-organisme is het niet-virulente karakter middels adequate tests aangetoond (4).
MVA is een sterk geattenueerde vacciniastam die zijn virulentie verloren heeft en gastheerspecifiek geworden is als gevolg van meer dan 570 passages in kippenembryo fibroblasten. De vacciniastam heeft een aantal deleties in het virale genoom en is niet meer in staat om in mensen of andere zoogdieren te vermenigvuldigen (1; 5). Uit vaccinatie resultaten en een groot aantal preklinische en klinische studies met MVA in mensen en dieren blijkt MVA niet-pathogeen te zijn (2; 6; 7). Naast MVA zijn ook

NYVAC, ALVAC en TROVAC sterk geattenueerde virusstammen. In NYVAC zijn een groot aantal specifieke gensequenties verwijderd waardoor de stam geattenueerd is en zeer slecht kan repliceren in zoogdiercellen (3; 8). Zowel ALVAC als TROVAC zijn geattenueerde avipoxvirussen die geen productieve infectie geven in mensen en zoogdieren. Deze stammen worden veelvuldig veilig gebruikt in dierexperimenten (3; 9). De genoomveranderingen die hebben geleid tot de attenuatie van bovengenoemde vacciniastammen zijn bekend en stabiel. Het gezaghebbende Center for Disease Control (CDC) in de Verenigde Staten alsmede het National Institutes of Health (NIH) heeft MVA, NYVAC, ALVAC en TROVAC ingeschaald op biosafety level 1 (10; 11; 12). Dit is het allerlaagste veiligheidsniveau en is bestemd voor onder andere handelingen met sterk geattenueerde virusstammen. Op basis van bovengenoemde argumenten is de COGEM van mening dat zowel MVA, NYVAC, ALVAC en TROVAC voldoen aan de criteria van pathogeniteitsklasse 1 virussen. De inschalings- en werkvoorschriften die volgen uit deze pathogeniteitsklasse zullen de risico's voor mens en milieu waarborgen voor handelingen met deze virussen.

De COGEM is van mening dat de WR stam van vaccinia ingedeeld dient te blijven in pathogeniteitsklasse 2, aangezien deze stam niet zo sterk geattenueerd is als bijvoorbeeld MVA. Daarbij dienen een aantal aanvullende voorschriften gesteld te worden voor laboratoriumwerkzaamheden met de WR vacciniastam. Deze werkzaamheden omvatten productie van recombinant WR, infectie van cellen met dit recombinant WR, recombinant WR in associatie met proefdieren en handelingen met cellen en weefsels afkomstig uit deze proefdieren. De COGEM is van mening dat voor deze werkzaamheden met de WR vacciniastam de volgende aanvullende voorschriften dienen te gelden:

I De volgende medewerkers zijn uitgesloten van deelname aan activiteiten met vaccinia vectoren:
- medewerkers die lijden aan eczeem of medewerkers die in hun naaste omgeving te maken hebben met lijders aan eczeem;
- medewerkers die zwanger zijn;
- medewerkers met een niet goed functionerend immuunsysteem;
- medewerkers die seropositief zijn voor HIV.

II Alle activiteiten die kunnen plaatsvinden in een veiligheidskabinet dienen te worden uitgevoerd in een klasse-II veiligheidskabinet, waarbij de medewerkers handschoenen dienen te dragen tot over de mouw van de laboratoriumjas.

III Beschermende handschoenen, neus- en mondmaskers en veiligheidsbril worden gedragen.

Voor activiteiten zoals het vervoeren of inspecteren van met de WR vacciniastam besmette dieren geldt alleen aanvullende voorschrift III. Voor werkzaamheden met recombinant WR in associatie met proefdieren en de hieruit afkomstige cellen en weefsels dient naast I, II en III het volgende aanvullende voorschrift opgenomen te worden:

IV Het dierverblijf wordt goed schoongehouden. Na morsen van besmet materiaal worden besmette oppervlakken direct ontsmet.

Voor handelingen met de MVA vacciniastam alsmede NYVAC, ALVAC en TROVAC kunnen volgens de COGEM de standaard voorschriften gelden voor de betreffende inperkingsniveaus zoals aangegeven is in de Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (4). De COGEM is van mening dat middels bovengenoemde classificatie en aanvullende voorschriften de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn voor werkzaamheden met recombinant WR, MVA, NYVAC, ALVAC en TROVAC.

Referenties

1. Moss, B. (1994). Dev Biol Stand 82, blz. 55-63
2. Moss, B. (1996). Proc Natl Acad Sci U S A 93, blz. 11341-8
3. Paoletti, E., Taylor, J., Meignier, B., Meric, C., and Tartaglia, J. (1995). Dev Biol Stand 84, blz. 159-63
4. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze Regeling (1998).
5. Spehner, D., Drillien, R., Proamer, F., Houssais-Pecheur, C., Zanta, M. A., Geist, M., Dott, K., and Balloul, J. M. (2000). Virology 273, blz. 9-15
6. Stittelaar, K. J., Kuiken, T., de Swart, R. L., van Amerongen, G., Vos, H. W., Niesters, H. G., van Schalkwijk, P., van der Kwast, T., Wyatt, L. S., Moss, B., and Osterhaus, A. D. (2001). Vaccine 19, blz. 3700-9
7. Sutter, G. and Moss, B. (1995). Dev Biol Stand 84, blz. 195-200
8. Tartaglia, J., Perkus, M. E., Taylor, J., Norton, E. K., Audonnet, J. C., Cox, W. I., Davis, S. W., van der Hoeven, J., Meignier, B., Riviere, M., and et, a. l. (1992). Virology 188, blz. 217-32
9. Taylor, J., Tartaglia, J., Riviere, M., Duret, C., Languet, B., Chappuis, G., and Paoletti, E. (1994). Dev Biol Stand 82, blz. 131-5
10. National Institutes of Health. Appendix D-56 [NIH Guidelines]. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1993. Internet: http://www4.od.nih.gov/oba/rac/guidelines_02/Appendix_D.htm (16 mei 2003)
11. National Institutes of Health. Modifications to NIH vaccinia immunization policy [Memorandum dated 8 Aug 1996]. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1996.
12. Centers for Disease Control and Prevention. Vaccinia (smallpox) vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), June 22, 2001. MMWR 2001;50. No. RR-10. Internet: http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/RR/RR5010.pdf (16 mei 2003)