

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

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

COGEM kenmerk
CGM/030708-01

BGGO nummer
GGO 02-030/2

Datum advies
11 juli 2003

Inleiding

De COGEM is door het Ministerie van VROM om advies gevraagd over inschaling van werkzaamheden betreffende het aan SARS gerelateerde coronavirus. De werkzaamheden omvatten het kloneren van individuele SARS genen ten behoeve van de productie van recombinante adenovirale vectoren en het testen van deze vectoren in vaccinatieexperimenten in knaagdieren.

De ziekte SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) is in november 2002 voor het eerst gesignaleerd in de provincie Guangdong in China en heeft zich daarna verder verspreid naar onder andere Taiwan, Vietnam, Singapore en Canada (4; 8). Volgens de meest recente cijfers van de WHO (World Health Organisation) zijn er tot op heden wereldwijd circa 8.400 mensen geïnfecteerd waarvan circa 800 zijn overleden als gevolg van SARS (10). De epidemie lijkt nu over haar hoogtepunt heen te zijn.

De incubatietijd van SARS bedraagt 2 tot 10 dagen en begint als een soort griep die zich vervolgens kan ontwikkelen tot een longontsteking. De meest voorkomende symptomen zijn acute hoge koorts, hoofdpijn, ademhalingsmoeilijkheden en pijn in de gewrichten. Later kunnen zich ernstiger symptomen voordoen aan het ademhalingskanaal zoals droge hoest, verminderde speekselproductie en in uitzonderlijke gevallen het ophoesten van sputum met bloed (9). Het virus verspreidt zich voornamelijk via druppeltjes door de lucht. Besmetting komt vermoedelijk tot stand via de luchtwegen en door intensief contact met patiënten of met besmette voorwerpen. Buiten het lichaam blijft het virus ongeveer één tot twee dagen infectieus, met name in faeces (9; 10).

SARS wordt nagenoeg zeker veroorzaakt door een nieuw coronavirus (1; 2; 13). Coronavirussen zijn enkelstrengs RNA-virussen met een relatief groot genoom ten opzichte van andere typen RNA-virussen. Er is een aantal coronavirussen bekend die voorkomen bij vogels en zoogdieren, waaronder de mens. Bij mensen zijn coronavirussen onder meer verantwoordelijk voor één op de drie verkoudheden. Vooral de epitheelcellen van de luchtwegen zijn vatbaar voor het virus. Coronavirussen worden op basis van genetische verwantschap onderverdeeld in drie subgroepen (12). Recent is de

nucleotidesequentie van het aan SARS gerelateerde coronavirus opgehelderd (3; 6). Uit de sequentie blijkt dat het SARS virus genetisch verschilt van alle andere bekende coronavirussen (1; 2).

Doel van de aanvrager

Het doel van de aanvrager is om individuele structurele genen van het aan SARS gerelateerde coronavirus tot expressie te brengen in adenovirale vectoren in het kader van het ontwikkelen van een vaccin tegen SARS. Voor de constructie van de vectoren worden de adenovirale vectoren Ad5 (adenovirus serotype 5) en Ad35 gebruikt. In deze vectoren zullen afzonderlijk vier verschillende structurele eiwitten van het SARS virus gekloneerd worden. Deze eiwitten zijn in zekere mate homoloog met structurele eiwitten van andere coronavirussen. Recombinante adenovirussen zullen geproduceerd worden met behulp van de PER.C6 zoogdiercellijn. Met de geproduceerde replicatie-deficiënte adenovirussen worden vaccinatieexperimenten uitgevoerd in knaagdieren.

Overwegingen en Advies

Het aan SARS gerelateerde coronavirus wordt tot nu toe door het Ministerie van VROM op grond van het voorzorgsprincipe ingeschaald in pathogeniteitsklasse 4. Uit de epidemiologische data van het afgelopen half jaar is de verspreidings- en besmettingsroute van SARS duidelijk geworden. Het virus verspreidt zich primair door intensief contact tussen mensen, zoals huidcontact en druppeltjesinfecties door bijvoorbeeld hoesten. Bescherming van de luchtwegen en veelvuldige desinfectie kunnen besmetting voorkomen (7). In de "Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)" van de CDC wordt voor het kweken van infectieus SARS virus Biosafety Level (BSL) 3 geadviseerd (11). Dit is de op één na hoogste veiligheidsklasse. De COGEM is van mening dat het aan SARS gerelateerde coronavirus beschouwd kan worden als een virus van pathogeniteitsklasse 3, daar het een virus, met beperkte letaliteit betreft, die middels quarantaine maatregelen goed in te perken is. In een eerder advies heeft de COGEM dit ook geadviseerd (CGM/030429-01). De risico's voor mens en milieu zullen verwaarloosbaar klein zijn indien de handelingen uitgevoerd worden onder de inperkingmaatregelen die verbonden zijn aan deze pathogeniteitsklasse.

In de onderhavige aanvraag worden de voorgenomen werkzaamheden uitgesplitst in vier onderdelen. Het betreft hier kloneringswerkzaamheden in *Escherichia coli*, productie van recombinante adenovirussen, vaccinatiestudies in knaagdieren en handelingen met cellen en weefsels afkomstig uit gevaccineerde dieren.

Onderdeel 1

In onderdeel 1 van de aanvraag worden kloneringswerkzaamheden beschreven van individuele structurele genen van het aan SARS gerelateerde coronavirus in *E. coli*. De COGEM acht op basis van pathogeniteitsklasse 3 een inschaling van kloneringswerkzaamheden op minimaal VMT niveau, volgens artikel 5.2.h van de Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (5), gerechtvaardigd.

Onderdeel 2

De handelingen in onderdeel 2 betreffen de productie van recombinante adenovirussen in zoogdiercellen. Het aan SARS gerelateerde coronavirus is een enkelstrengs membraanbevattend RNA virus, terwijl de adenovirale vector een dubbelstrengs DNA virus is. Beide virussen zijn afkomstig uit niet-verwante virusfamilies waarbij de structuuropbouw van het virion en het nucleoproteïne (helicoïdaal versus icoesaëdrisch). Adenovirussen hebben geen lipide membraan waardoor structurele oppervlakte eiwitten van het aan SARS gerelateerde coronavirus niet ingebouwd kunnen worden (12). Hierdoor acht de COGEM het ontstaan van chimere adenovirussen met veranderde biologische eigenschappen, zoals tropisme, pathogeniteit en virulentie, onwaarschijnlijk. Op basis van bovengenoemde argumenten en het feit dat SARS beschouwd kan worden als een pathogeniteitsklasse 3 virus, is de COGEM van mening dat de productie van recombinante adenovirussen in PER.C6 cellijnen ingeschaald kunnen worden op C-I niveau. Als aanvullend voorschrift adviseert de COGEM om gedurende het productieproces van de onderhavige vectoren in dezelfde ruimte geen handelingen te verrichten met wildtype adenovirussen of replicatie competente adenovirus bevattende vectorstocks. Hiermee wordt het risico van accidentele contaminatie met replicatie-competent adenovirus verkleind. Met inachtneming van dit aanvullend voorschrift en inschaling op C-I niveau is afwezigheid van risico's voor mens en milieu voldoende gewaarborgd.

Onderdeel 3 en 4

In onderdeel 3 worden vaccinatieexperimenten in knaagdieren uitgevoerd met genetisch gemodificeerde adenovirale virussen die in onderdeel 2 geproduceerd zijn. De COGEM kan instemmen met de inschaling van de werkzaamheden op D-II niveau met inachtneming van de volgende aanvullende voorschriften. Deze voorschriften zijn standaard voor het gebruik van ratten of muizen in associatie met adenovirale vectoren (CGM/000330-01) en dienen om aërosolver spreiding van virusdeeltjes te voorkomen:

- de dieren worden gehuisvest in filtertopkooien.
- open handelingen, waaronder alle handelingen waarbij een besmette filtertopkooi geopend wordt, dienen in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd te worden, waarbij handschoenen gedragen moeten worden.
- materiaal dat in aanraking is geweest met genetisch gemodificeerde micro-organismen wordt gesteriliseerd of ontsmet met een gevalideerde methode voordat het wordt gewassen, hergebruikt of als afval afgevoerd.

Handelingen met cellen en weefsels afkomstig van de dieren uit het derde onderdeel kunnen volgens de COGEM plaatsvinden op C-I niveau op basis van de overwegingen bij onderdeel 2. De COGEM is van mening dat met de beoogde inschaling en aanvullende voorschriften de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., Van Der Werf, S., Brodt, H. R., Becker, S., et al. (2003). *N Engl J Med* **348**, blz. 1967-76
2. Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., et al. (2003). *N Engl J Med* **348**, blz. 1953-66
3. Marra, M. A., Jones, S. J., Astell, C. R., Holt, R. A., Brooks-Wilson, A., Butterfield, Y. S., et al. (2003). *Science* **300**, blz. 1399-404
4. Poutanen, S. M., Low, D. E., Henry, B., Finkelstein, S., Rose, D., Green, K., Tellier, R., Draker, R., Adachi, D., Ayers, M., Chan, A. K., Skowronski, D. M., Salit, I., Simor, A. E., Slutsky, A. S., Doyle, P. W., Krajden, M., Petric, M., Brunham, R. C., and McGeer, A. J. (2003). *N Engl J Med* **348**, blz. 1995-2005
5. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze Regeling (1998).
6. Rota, P. A., Oberste, M. S., Monroe, S. S., Nix, W. A., Campagnoli, R., Icenogle, J. P., Penaranda, S., et al. (2003). *Science* **300**, blz. 1394-9
7. Seto, W. H., Tsang, D., Yung, R. W., Ching, T. Y., Ng, T. K., Ho, M., Ho, L. M., and Peiris, J. S. (2003). *Lancet* **361**, blz. 1519-20
8. Tsang, K. W., Ho, P. L., Ooi, G. C., Yee, W. K., Wang, T., Chan-Yeung, M., Lam, W. K., Seto, W. H., Yam, L. Y., Cheung, T. M., Wong, P. C., Lam, B., Ip, M. S., Chan, J., Yuen, K. Y., and Lai, K. N. (2003). *N Engl J Med* **348**, blz. 1977-85
9. Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport, Internet: <http://www.minvws.nl/> (23 april 2003)
10. World Health Organization (WHO), Internet: <http://www.who.int/csr/sars/en/> (7 juli 2003)
11. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Internet: <http://www.cdc.gov/ncidod/sars/index.htm> (7 juli 2003)
12. Van Regenmortel, M.H.V. et al. 2000. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press.
13. Peiris, J. S., Lai, S. T., Poon, L. L., Guan, Y., Yam, L. Y., Lim, W., Nicholls, J., et al. (2003). *Lancet* **361**, blz. 1319-25