

Advies betreffende: **Toediening van adenoviraal FGF-4 in gestente kransslagaders van varkens**

Kennisgever: **Universiteit Maastricht**

COGEM kenmerk
CGM/031031-06

BGGO nummer
GGO 02-305/2

Datum advies
31 oktober 2003

Inleiding

In Nederland lijden veel mensen aan hart- en vaatziekten. Een belangrijke oorzaak van deze ziekten is arteriosclerose, ook wel aderverkalking genoemd. Aan arteriosclerose ligt een hoge bloeddruk ten grondslag. Als gevolg van een hoge bloeddruk kunnen beschadigingen in de vaatwand ontstaan waarop zich gemakkelijk vetten en cholesterol kunnen afzetten. Hierdoor worden de bloedvaten langzaam nauwer en slibben ze dicht. De weerstand in de bloedvaten neemt door het dicht slibben toe waardoor het hart harder moet pompen. Dit kan leiden tot een verdikte hartspier of uiteindelijk tot een verzwakt hart (9). Arteriosclerose in de kransslagaders kan leiden tot een hartinfarct.

Het plaatsten van een stent (kokertje van gaas) in kransvaten is een veelgebruikte therapie om het bloedvat open te houden en de doorbloeding te handhaven, zodat zuurstoftekort en daarmee een infarct, voorkomen kan worden. Een belangrijk nadeel van stentplaatsing is dat een sterke groei van gladde spiercellen (neointima) in de stent het resultaat verzwakt. Het doel van het onderzoek is om te achterhalen of deze neointima toenemen als het adenovirale construct, met de betreffende hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), ten tijde van de stent plaatsing toegediend wordt. Dit zal nader onderzocht worden met behulp van een MRI scan.

Het HIF-1 α is in eerdere studies in varkens toegediend om te onderzoeken of het mogelijk is nieuwvorming van bloedvaten (angiogenese) te stimuleren. HIF is een transcriptiefactor die de expressie van genen, die reageren op een lage zuurstof concentratie in weefsels, reguleert (7).

De adenovirale vector Ad2HIF-1 α /VP16

In het experiment wordt gebruik gemaakt van een replicatie-deficiënte recombinante adenovirale vector, Ad2 (humaan serotype 2). Bij deze vector zijn de E1- en de E4-regio (met uitzondering van ORF6) van het virale genoom verwijderd (7). Verwijdering van deze regionen verkleint de kans op recombinatie (4). Tevens is het pIX gen verplaatst van de E2- naar het restant van de E4-regio, wat de kans op functionele recombinatie verder verkleint (1).

In deze adenovirale vector is de hybride HIF-1 α /VP16 gekloneerd die onder controle staat van een *Cytomegalovirus* (CMV) promotor. De hybride bestaat uit de DNA-bindings- en dimerisatiedomeinen van het HIF-1 α en het transactivatiedomein van het *Human herpesvirus 1* (synoniem Herpes simplex virus) VP-16 eiwit. Vervanging van het HIF-1 α transactivatiedomein geeft HIF een bescherming tegen snelle afbraak (7).

De productie van deze adenovirale vector vindt onder GMP condities in de Verenigde Staten plaats. De vector wordt in de intramyocardiaal in varkens geïnjecteerd als een enkele dosis van ten hoogste 10^{10} virale partikels.

De COGEM is gevraagd om advies uit te brengen over de inschaling van handelingen ten behoeve van het onderzoek naar de toename van neointima in stenten als gevolg van het toedienen van het adenovirale construct Ad2HIF-1 α /VP16 in varkens.

Overweging en advies

Veiligheid virusbatch

De aanvrager heeft aangegeven dat de productie van het adenovirale construct in de Verenigde Staten plaatsvindt. Alvorens de virusbatch toe te dienen aan de varkens moet worden vastgesteld of de batch vrij is van replicatie-competente adenovirussen (RCA's). Direct na toediening van de virusbatch treedt namelijk 'shedding' op en uitgescheiden RCA's zouden op deze manier in het milieu verspreid kunnen worden.

In het onderhavige experiment wordt gebruik gemaakt van een replicatie-deficiënte recombinante adenovirale vector, Ad2, waarbij de E1- en de E4-regio van het virale genoom verwijderd zijn. Door een dergelijke constructie van de adenovirale vector is de kans op vorming van RCA's tijdens de productie van de vector zeer onwaarschijnlijk (4). Uit de door de aanvrager geleverde testresultaten blijkt dat in de gebruikte adenovirale virusbatches minder dan één RCA per dosis aanwezig is. Dezelfde virusbatch wordt ook gebruikt in humane gentherapie studies, maar dit feit op zich is geen argument om te concluderen dat de batch veilig is. Wel kan het argument aangevoerd worden dat er in deze studies geen 'shedding' is opgetreden aangezien in mensen geen virus kon worden aangetoond in de uitstrijkjes van neus, keel, urine en faeces. Tevens merkt de COGEM op dat de te gebruiken vectorbatch volgens GMP eisen geproduceerd is en in het buitenland reeds is goedgekeurd.

Op basis van bovenstaande argumenten is de COGEM van mening dat de, door de kennisgever aangeleverde, testgegevens voldoende zijn om te concluderen dat in de virusbatch geen RCA's aanwezig zijn en dat de virusbatch als veilig kan worden beschouwd.

Replicatie-competente adenovirussen (RCA)

Na toediening van de recombinant adenovirale vector is het mogelijk dat door recombinatie met andere virussen RCA's geproduceerd worden. Bij varkens komen er drie subgroepen adenovirussen voor (*Porcine adenovirus A-C*) (6). Deze virussen zijn soortspecifiek en hebben een geringe homologie (5-20%) met humane adenovirussen. Van twee *Porcine adenovirussen* is de gehele nucleotidesequentie bekend. Deze twee virussen, *Porcine adenovirus 3* (groep C) en *Porcine adenovirus 2* (groep A), vertonen respectievelijk 14,4 en 19,6 % homologie op nucleotide niveau met het wildtype humane *adenovirus type 2*. De kans dat recombinatie tussen virussen optreedt is afhankelijk van de mate van homologie tussen twee sequenties. Door de geringe homologie tussen de humane en varkens adenovirussen is de kans op recombinatie met de vector en de vorming van RCA's uiterst klein. In het experiment wordt bovendien gebruik gemaakt van 'specified pathogen free' (SPF) varkens. Dat zijn varkens die vrij zijn van een aantal gespecificeerde ziektekiemen. De varkens worden met een keizersnede ter wereld

gebracht en na de geboorte worden de biggen zodanig gehuisvest dat ze van ziektekiemen afgeschermd zijn (10). De kans dat in deze biggen, voorafgaand aan het onderhavige experiment, een adenovirus aanwezig zou zijn is dan ook gering.

Adenovirussen kunnen lang in het varken aanwezig blijven waarbij het niet duidelijk is of er sprake is van een echte latentie of dat op laag niveau replicatie plaatsvindt (3; 8). Latente virussen kunnen door verschillende omstandigheden gereactiveerd worden, zoals een verminderde functie of suppressie van het immuunsysteem (2; 5). Activatie van latente adenovirussen is voornamelijk waargenomen in immuungecompromitteerde humane patiënten, die transplantaties hadden ondergaan of geïnfecteerd waren met HIV (2). Gezien de rol van het immuunsysteem is het van belang dat de varkens die geïnfecteerd zijn met een adenovirale vector een goed functionerend immuunsysteem houden. Om de kans op RCA's verder te beperken is het van belang dat het dier, zoals in aanvullend voorschrift b in onderdeel 1 van het voorstel tot inschaling opgesteld door Bureau GGO ("bij de start van de vaccinatie mogen de apen c.q. varkens geen acute adenovirale infectie doormaken en niet immuungecompromitteerd zijn") is beschreven, ten tijde van het experiment geen acute infectie doormaakt.

Virusshedding

De door de aanvrager aangeboden testgegevens betreffende 'shedding' van adenovirale partikels, zijn uitgevoerd met twee varkens. Hierbij is getest op de aanwezigheid van het virus in urine en faeces, 1 en 24 uur na toediening. Op beide tijdstippen kon geen virus worden aangetoond.

In de klinische trials zijn humane patiënten na: 2, 3, 7, 14, 21 en 28 dagen gecontroleerd op 'shedding' waarbij het recombinant adenovirus telkens niet aangetoond kon worden. Dit is een indicatie dat bij varkens eveneens twee en drie dagen na toediening van het virale construct geen shedding zal optreden.

Op grond van bovengenoemde gegevens acht de COGEM de kans dat drie dagen na toediening van de vectorbatch nog 'shedding' optreedt verwaarloosbaar klein. Bovendien is de vectorbatch gecontroleerd op de afwezigheid van RCA's en acht de COGEM de batch veilig.

Terugplaatsing naar D-I niveau

De dieren kunnen alleen op D-I niveau teruggeplaatst worden nadat met een adequate test geen 'shedding' van adenovirale vectoren meer is aangetoond. De aanvrager levert 'sheddingdata' van een eerder uitgevoerd experiment, waaruit blijkt dat 24 uur na toediening van de virale vector geen virus meer aangetoond is in urine en faeces van varkens. Derhalve is de COGEM van mening dat na terugplaatsing van de varkens naar D-I niveau het aanvullende voorschrift g in onderdeel 2 van het voorstel tot inschaling ("tijdens de werkzaamheden in het dierverblijf wordt beschermende kleding, mond- en neuskapjes en handschoenen gedragen") niet noodzakelijk meer is.

In het verleden heeft de COGEM geadviseerd (CGM/020513-03) apen, na toediening van een replicatie-deficiënte recombinant adenovirale vector, minimaal zeven dagen op D-II te huisvesten alvorens te kunnen overgaan op terugplaatsing naar D-I. Bij apen circuleren naast simian adenovirussen ook humane adenovirussen. Hierdoor is een theoretische kans op recombinitie en het ontstaan van RCA's aanwezig. Bij varkens is het risico veel kleiner omdat adenovirussen van varkens soortspecifiek zijn en een geringe homologie hebben met humane adenovirussen (6). De kans op het ontstaan van

RCA's in varkens is daardoor kleiner dan in apen. Bovendien is de kans dat bij de gebruikte SPF-varkens een adenovirus aanwezig zou zijn veel kleiner dan bij willekeurige apen.

Samenvattend kan worden gesteld dat:

- De controle van de vectorbatch op de juiste wijze wordt uitgevoerd waardoor de virusbatch als veilig kan worden beschouwd.
- De adenovirale vector een lage homologie vertoont met adenovirussen in varkens, waardoor de kans op recombinatie en de vorming van RCA's uiterst klein is.
- Door het gebruik van SPF-varkens de kans op reactivatie en vorming van RCA's verder verkleind wordt.
- De resultaten van de 'sheddingexperimenten' bij varkens uitwijzen dat 24 uur na toediening van de vector geen shedding meer optreedt.
- De gegevens uit de klinische trials wijzen op het uitblijven van 'shedding' bij varkens twee en drie dagen na toediening van de virale vector.

Op basis van bovenstaande argumenten is de COGEM van mening dat de varkens drie dagen na vectortoediening teruggeplaatst kunnen worden op D-I niveau waarbij de aanvullende eisen d van het voorstel tot inschaling ("de met adenovirale vectoren gevaccineerde apen c.q. varkens kunnen teruggeplaatst worden naar D-I nadat met een gevalideerde PCR de afwezigheid van adenovirale vectoren in serum en urine is aangetoond") en e ("terugplaatsing naar D-I kan plaatsvinden nadat de testuitslag voor minimaal zeven opeenvolgende dagen negatief heeft uitgewezen") uit onderdeel 1 en aanvullende voorschrift f van het voorstel tot inschaling ("met een adequate test is de afwezigheid van adenovirale vectoren aangetoond") uit onderdeel 2 kunnen komen te vervallen.

Transport naar de MRI-faciliteit

In het onderhavige experiment verblijven de dieren in een faciliteit op D-I niveau alvorens vervoerd te worden naar de MRI-faciliteit om daar een MRI-scan te ondergaan. De kans op 'shedding' van adenovirale partikels uit deze varkens die teruggeplaatst zijn op D-I niveau acht de COGEM verwaarloosbaar klein. Omdat er hier sprake is van handelingen met proefdieren in associatie met genetisch gemodificeerde micro-organismen is het van belang dat de varkens niet kunnen ontsnappen. Om deze reden is de COGEM van mening dat de varkens verdoofd dienen te worden in het dierverblijf en vervolgens vervoerd dienen te worden naar de MRI-faciliteit alwaar de dieren tijdens de handelingen onder anesthesie worden gehouden. Na behandeling in de MRI-faciliteit wordt het varken onder verdoving naar het dierverblijf vervoerd.

Het vervoer van het verdoofde varken van het dierverblijf naar de MRI-faciliteit en vice-versa dient te geschieden in een gesloten en lekvrije bak (onderkant en zijkanten gesloten) die kan worden afgesloten met een deksel waarin enkele luchtgaten zijn aangebracht. Het deksel moet over de randen van de bak vallen.

Literatuur

1. Hehir, K. M., Armentano, D., Cardoza, L. M., Choquette, T. L., Berthelette, P. B., White, G. A., Couture, L. A., Everton, M. B., Keegan, J., Martin, J. M., Pratt, D. A., Smith, M. P., Smith, A. E., and Wadsworth, S. C. (1996). Molecular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to

prevent their occurrence. *J Virol* **70**, blz. 8459-67

2. Hierholzer, J. C. (1992). Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev* **5**, blz. 262-74

3. Imler, J. L., Bout, A., Dreyer, D., Dieterle, A., Schultz, H., Valerio, D., Mehtali, M., and Pavirani, A. (1995). Trans-complementation of E1-deleted adenovirus: a new vector to reduce the possibility of codissemination of wild-type and recombinant adenoviruses. *Hum Gene Ther* **6**, blz. 711-21

4. Lusky, M., Christ, M., Rittner, K., Dieterle, A., Dreyer, D., Mouroto, B., Schultz, H., Stoeckel, F., Pavirani, A., and Mehtali, M. (1998). In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol* **72**, blz. 2022-32.

5. Smith, K., Brown, C. C., and Spindler, K. R. (1998). The role of mouse adenovirus type 1 early region 1A in acute and persistent infections in mice. *J Virol* **72**, blz. 5699-706

6. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses.

7. Vincent, K. A., Shyu, K. G., Luo, Y., Magner, M., Tio, R. A., Jiang, C., Goldberg, M. A., Akita, G. Y., Gregory, R. J., and Isner, J. M. (2000). Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1alpha/VP16 hybrid transcription factor. *Circulation* **102**, blz. 2255-61

8. Vorburger, S. A. and Hunt, K. K. (2002). Adenoviral gene therapy. *Oncologist* **7**, blz. 46-59

9. Wikipedia free encyclopedia: <http://en.wikipedia.org/wiki/Atherosclerosis> (23-10-2003)

10. Reformatorisch dagblad: <http://oud.refdag.nl/weet/991207weet10.html> (24-10-2003)