

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

**Cogem**  
**postbus 578**  
**3720 AN Bilthoven**

Aan de Staatssecretaris van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke  
Ordening en Milieubeheer  
De heer drs. P.L.B.A. van Geel  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

Uw kenmerk	Uw brief van	Kenmerk	Datum
IG 03-189/01.co1	14 oktober 2005	CGM/051028-01	28 oktober 2005
Onderwerp	Advies kennisgeving IG 03-189/1		

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de adviesvraag van het ministerie van VROM betreffende ontwerpbesikking IG 03-189/1, getiteld 'Recombinant RSV vaccin', van het Nederlands Vaccin Instituut, adviseert de COGEM als volgt.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's voor mens en milieu van handelingen met een genetisch gemodificeerd *Respiratory syncytial virus* (RSV) op ML-I en DM-I inperkingsniveau. Het doel van de aanvrager is om een verzwakt (geattenuëerd) levend vaccin te ontwikkelen tegen RSV. RSV kan bij vooral jonge kinderen ernstige verkoudheid (bronchiolitis) veroorzaken. De aanvrager heeft reeds een vergunning om met dit pathogeniteitsklasse 2 virus te werken onder ML-II en DM-II condities. Op grond van experimentele gegevens over de mate van pathogeniteit van de recombinante virusstammen rRSV X en  $\Delta$ G rRSV-X, verzoekt de aanvrager om de werkzaamheden op een lager inperkingsniveau te laten plaatsvinden.

De aangebrachte nucleotidenwijzigingen in de betreffende recombinante virussen zijn niet gespecificeerd, waardoor de moleculaire basis van de veronderstelde attenuatie ontbreekt. Hierdoor is het voor de COGEM moeilijk om in te schatten hoe stabiel de aangebrachte mutaties zijn. Tevens zijn de aangeleverde gegevens over experimenten in cellijnen en katoenratten niet eenduidig te interpreteren, onder andere vanwege het ontbreken van een statistische onderbouwing. Ook tonen enkele experimenten aan dat de recombinante virussen nog steeds in staat zijn om zich te vermenigvuldigen in cellen, waardoor verspreiding mogelijk is. Derhalve is de COGEM van mening dat uit de aangeleverde gegevens de attenuatie van de recombinante RSV stammen onvoldoende blijkt en dat de experimenten niet op ML-I en DM-I inperkingsniveau plaats kunnen vinden, zonder de veiligheid van mens en milieu in het geding te brengen.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke on the right that ends in a small hook.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman

c.c. Dr. ir. B.P. Loos  
Dr. I. van der Leij

# **Titel: Omlaagschaling van handelingen met een recombinant *Respiratory syncytial virus* (RSV) naar ML-I en DM-I inperkingsniveau**

**COGEM advies: CGM/051028-01**

## **Inleiding**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's voor mens en milieu van handelingen met een genetisch gemodificeerd *Respiratory syncytial virus* (RSV) op ML-I en DM-I inperkingsniveau. Het doel van de aanvrager is om een vaccin te ontwikkelen tegen RSV. Hiertoe zullen laboratoriumexperimenten met twee potentiële vaccinstammen uitgevoerd worden in een ML-I laboratorium en proefdierexperimenten met muizen en ratten in een DM-I laboratorium.

RSV is een niet-gesegmenteerd negatief-strengig RNA virus met membraan. Het virus behoort tot de *Pneumovirinae*, genus *Pneumovirus*. Evenals het verwante *Metapneumovirus*, wordt RSV ondergebracht in de familie van de paramyxovirussen (10; 12). Het merendeel van de paramyxovirussen, waaronder RSV, zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2 (8).

De jaarlijkse uitbraken van respiratoire infecties bij mensen is veelal te wijten aan RSV. De klinische symptomen van infectie met RSV zijn milde klachten van de bovenste luchtwegen. Wanneer de lagere luchtwegen geïnfecteerd worden kan echter bronchiolitis optreden. Vooral bij zeer jonge kinderen kunnen deze infecties tot ernstige ademhalingsproblemen leiden, met soms de dood tot gevolg (11). Alleen al in de Verenigde Staten worden jaarlijks tussen de 75.000 en 125.000 jonge kinderen in het ziekenhuis opgenomen met een RSV infectie (9).

De huidige vaccinatiepraktijken hebben duidelijk gemaakt dat vaccins van geïnactiveerde virussen of antilichamen tegen het virus niet effectief genoeg zijn (6; 7). De ontwikkeling van een effectief vaccin tegen RSV zal het aantal infecties sterk verminderen bij met name de risicogroepen. Het doel van de aanvrager is om een effectief vaccin tegen RSV te ontwikkelen op basis van een recombinant verzwakt levend virus (3).

## **De adviesvraag**

De COGEM is verzocht een advies uit te brengen over handelingen met een tweetal recombinante RSV-stammen op een lager inperkingsniveau dan op grond van de pathogeniteitsklasse van RSV toebedeeld is. De aanvrager heeft reeds een vergunning

om handelingen met genetisch gemodificeerd RSV in associatie met proefdieren (muizen, ratten en katoenratten) op DM-II niveau en laboratoriumexperimenten op ML-II niveau uit te voeren. Het gaat bij deze experimenten om twee genetisch gemodificeerde RSV-stammen, te weten recombinant RSV-X en  $\Delta G$  RSV-X (rRSV X en  $\Delta G$  rRSV-X). De eerstgenoemde stam is verkregen via 'reverse genetics' en bevat enkele puntmutaties waardoor nieuwe restrictiesites gecreëerd zijn in niet-coderende sequenties van het RSV genoom. De tweede stam,  $\Delta G$  rRSV-X, bevat een deletie van het volledige gen coderend voor het virale G-eiwit, dat betrokken is bij de aanhechting van het virus aan de gastheercel. Op basis van niet nader genoemde overwegingen verzoekt de aanvrager om de reeds vergunde laboratorium- en proefdierexperimenten op respectievelijk ML-I en DM-I niveau plaats te laten vinden.

### **Overweging en advies**

In onderhavige vergunningaanvraag wordt gebruikt gemaakt van twee recombinante RSV stammen die getest zullen worden in proefdiermodellen ten behoeve van de ontwikkeling van een levend geattenuëerd (verzwakt) vaccin. Beide recombinante stammen rRSV-X en  $\Delta G$  rRSV-X zijn afgeleid van een wild type RSV stam X (veldisolat uit 1998). In de recombinante stammen zijn met behulp van 'reverse genetics' op enkele plaatsen nucleotidenwijzigingen aangebracht in de niet-coderende sequenties tussen enkele genen, waardoor restrictiesites ontstaan. De exacte plaats en aard van de mutaties in het virale genoom van beide virusstammen worden door de aanvrager niet geleverd, waardoor de moleculaire basis van de door de aanvrager veronderstelde attenuering ontbreekt. Hierdoor is het volgens de COGEM ook moeilijk om in te schatten hoe stabiel de aangebrachte mutaties zijn, aangezien hier geen gegevens over zijn aangeleverd. Indien de sequentieveranderingen in een gebied op het virale genoom plaatsvindt dat sterk onderhevig is aan natuurlijke mutaties, is de kans aanwezig dat de aangebrachte mutaties ongedaan gemaakt worden. Hierdoor kunnen de recombinante virussen 'terugmuteren' (reverteren) tot virulente virussen.

In de recombinant  $\Delta G$  rRSV-X is naast de nucleotidenwijzigingen ook het gen gedeleteerd dat codeert voor het G-eiwit. Literatuurgegevens tonen aan dat een gedeeltelijke deletie van het gen coderend voor het G-eiwit in wild type RSV tot gevolg heeft dat de efficiëntie van infectie van een humane epitheelcellijn (HEp-2) sterk verlaagd wordt (5). De HEp-2 cellijn is een van oorsprong carcinogene cellijn die representatief is voor het longepitheel dat RSV kan infecteren.

De verminderde pathogeniteit van de in de onderhavige aanvraag gebruikte recombinante virusstammen rRSV-X en  $\Delta G$  rRSV-X voor mensen wordt onder andere aangetoond door *in vitro* experimenten met HEp-2 cellen. Volgens de aanvrager tonen de experimenten aan dat de recombinante stammen een lagere

infectiviteit hebben voor humane cellen dan het uitgangsvirus. Op grond van dit experiment en andere niet aangeleverde experimenten met humane cellen, concludeert de aanvrager dat dit een indicatie is dat de recombinante virusstammen geattenueerd zijn voor mensen. Uit het experiment blijkt echter dat de recombinante virusstammen nog steeds, weliswaar op een lager niveau, in HEp-2 cellen kunnen repliceren. Hieruit blijkt dat de recombinante virussen in mensen zich nog steeds kunnen repliceren en verspreiden. Daarbij is de COGEM van mening dat de resultaten van het getoonde experiment met HEp-2 cellen lastig te interpreteren zijn gezien het feit dat een statistische onderbouwing en een nadere beschrijving van de gehanteerde controles ontbreken. Concluderend acht de COGEM het beschreven experiment in één humane cellijn onvoldoende om te concluderen dat de recombinante virusstammen geattenueerd zijn voor mensen.

Voorts levert de aanvrager gegevens van *in vivo* proefdierexperimenten met katoenratten om aan te tonen dat de recombinante virusstammen verzwakt zijn. Om de pathologie van RSV infecties te bestuderen worden vaak katoenratten gebruikt (4; 7). Knaagdieren zijn geen natuurlijke gastheer voor het humane RSV. Voor efficiënte virusreplicatie in deze proefdieren zal derhalve een relatief hoge virusdosis nodig zijn om replicatie van het virus en pathologische verschijnselen waar te nemen (4). In het door de aanvrager aangeleverde experiment, waarin katoenratten geïnfecteerd zijn met de recombinante virusstammen, wordt aangetoond dat er minder replicatie van de virusstam rRSV-X is ten opzichte van het uitgangsvirus. De recombinant  $\Delta$ G rRSV-X is volgens de aanvrager helemaal niet meer detecteerbaar in katoenratten. Het is echter niet duidelijk of dit ook waargenomen wordt bij een hogere virusdosis, aangezien maar één enkele dosis getest is. Uit dit experiment blijkt volgens de COGEM dat de infectiviteit van de recombinante virusstammen in katoenratten weliswaar lager is, maar dat in ieder geval voor de recombinante rRSV-X virusstam nog steeds replicatie optreedt. Met betrekking tot de pathologie van beide recombinante virusstammen in katoenratten, zijn de door de aanvrager aangeleverde gegevens volgens de COGEM moeilijk éénduidig te interpreteren. Hierdoor is het niet duidelijk of de recombinante RSV stammen geen of verminderde klinische symptomen veroorzaken in katoenratten danwel mensen. Daarbij blijkt uit gegevens van de aanvrager dat in niercellen uit apen (Vero cellen) beide recombinanten een vergelijkbare vermenigvuldiging (replicatie) te hebben ten opzichte van wild type RSV. Deze resultaten duiden erop dat de veronderstelde attenuatie van de recombinante virusstammen verschillend is voor katoenratten, apencellen en humane HEp-2 cellen.

Omlaagschaling naar het laagste inperkingsniveau (ML-I en DM-I) van handelingen met recombinante virussen is eerder bij de COGEM aan de orde geweest. De COGEM heeft destijds geadviseerd dat enkele pokkenvirusstammen, waaronder MVA, beschouwd kunnen worden als pathogeniteitsklasse 1 virussen (1; 2). Dit betekent onder meer dat werkzaamheden plaats kunnen vinden op minimaal ML-I

inperkingsniveau. De COGEM heeft destijds omlaagschaling geadviseerd aangezien de betreffende virusstammen sterk geattenueerde vacciniastammen zijn die niet meer in staat zijn om in mensen of andere zoogdieren infectieuze nakomelingen te produceren. Daarbij is bijvoorbeeld het MVA veelvuldig gebruikt voor vaccinatie tegen pokken in ongeveer 120.000 mensen zonder dat daarbij incidenten optraden. Tevens is gebleken dat zelfs in immuundeficiënte dieren MVA niet-pathogeen is.

De in de onderhavige aanvraag aangeleverde gegevens zijn volgens de COGEM echter onvoldoende om te concluderen dat recombinante virusstammen rRSV-X en  $\Delta$ G rRSV-X dusdanig geattenuerd zijn dat experimenten op ML-I of DM-I inperkingsniveau kunnen plaatsvinden. Bovendien tonen de experimentele gegevens aan dat de virusstammen nog steeds het vermogen bezitten om in onder andere humane cellen te repliceren en is onduidelijk of de recombinante virussen ziektesymptomen teweeg kunnen brengen.

Concluderend is de COGEM van mening dat op grond van bovengenoemde argumenten de beschreven experimenten met de recombinante virusstammen rRSV-X en  $\Delta$ G rRSV-X plaats dienen te vinden op ML-II en DM-II inperkingsniveau teneinde de veiligheid van mens en milieu te waarborgen.

## Referenties

1. COGEM advies CGM/030519-06, Classificatie geattenueerde pokkenvirusstammen en aanvullende voorschriften.
2. COGEM advies CGM/031031-08, Classificatie geattenueerde pokkenvirusstammen.
3. Collins, P. L. and Murphy, B. R. (2005). New generation live vaccines against human respiratory syncytial virus designed by reverse genetics. *Proc Am Thorac Soc* **2**, blz. 166-73.
4. Domachowske, J. B., Bonville, C. A., and Rosenberg, H. F. (2004). Animal models for studying respiratory syncytial virus infection and its long term effects on lung function. *Pediatr Infect Dis J* **23**, blz. S228-34.
5. Elliott, M. B., Pryharski, K. S., Yu, Q., Parks, C. L., Laughlin, T. S., Gupta, C. K., Lerch, R. A., Randolph, V. B., LaPierre, N. A., Dack, K. M., and Hancock, G. E. (2004). Recombinant respiratory syncytial viruses lacking the C-terminal third of the attachment (G) protein are immunogenic and attenuated in vivo and in vitro. *J Virol* **78**, blz. 5773-83.
6. Piedra, P. A. (2003). Clinical experience with respiratory syncytial virus vaccines. *Pediatr Infect Dis J* **22**, blz. S94-9.

7. Prince, G. A., Curtis, S. J., Yim, K. C., and Porter, D. D. (2001). Vaccine-enhanced respiratory syncytial virus disease in cotton rats following immunization with Lot 100 or a newly prepared reference vaccine. *J Gen Virol* **82**, blz. 2881-8.
8. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze Regeling (1998).
9. Shay, D. K., Holman, R. C., Newman, R. D., Liu, L. L., Stout, J. W. and Anderson, L. J. (1999). Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA* **282**, blz. 1440-6.
10. Stockton, J., Stephenson, I., Fleming, D. and Zambon, M. (2002). Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis* **8**, blz. 897-901.
11. Tripp, R. A. (2004). Pathogenesis of respiratory syncytial virus infection. *Viral Immunol* **17**, blz. 165-81.
12. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.