

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

**DATUM** 16 mei 2006  
**KENMERK** CGM 060516-01  
**ONDERWERP** Advies bioluminescentie-experimenten met adenovirale vectoren (IG 99-035/05)

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de aanvraag tot wijziging van vergunning IG 99-035/05, getiteld 'Adenovirale vectoren voor kankertherapie', van het VU medisch Centrum, adviseert de COGEM als volgt.

**Samenvatting:**

De COGEM is verzocht te adviseren over handelingen met muizen en ratten die zijn geïnjecteerd met recombinante adenovirussen. De adenovirussen kunnen zich of alleen in tumorcellen (conditioneel-replicerend) of in het geheel niet (replicatiedeficiënt) vermenigvuldigen. De aanvrager is van plan zogenaamde bioluminescentie-experimenten uit te voeren waarmee de effectiviteit van op adenovirus gebaseerde kankertherapieën bij proefdieren wordt onderzocht. Voor het uitvoeren van de experimenten worden de dieren uit een filtertopkooi gehaald, genarcotiseerd en in een open container naar de bioluminescentie-apparatuur gebracht. De aanvrager verzoekt deze open handelingen te mogen uitvoeren binnen de DM-II ruimte.

Tijdens de productie van replicatiedeficiënte vectoren kan door de aanvrager niet worden uitgesloten dat door ongewenste recombinatie een replicerend virus ontstaat. Hoewel de COGEM de kans zeer klein acht dat het eventuele replicerende virus het genarcotiseerde proefdier kan verlaten en vervolgens de laboratoriummedewerker infecteert, kan zij dit niet uitsluiten. De aanvrager geeft hiernaast aan dat enkele conditioneel-replicerende virussen een breed gastheerbereik hebben verkregen. Hierdoor ontstaat de kans dat, indien deze vectoren vrij komen in het milieu, ze (oog)infecties kunnen veroorzaken. De COGEM adviseert dan ook om laboratoriummedewerkers ten tijde van het experiment een mondkapje (N-95 of hogere specificatie) en een standaard laboratoriumbril te laten dragen zodat de risico's van eventuele spatincidenten voorkomen worden.

Het bovenstaande in overweging nemende is de COGEM van mening dat de veiligheid voor mens en milieu gewaarborgd blijft als de werkzaamheden in een DM-II dierversluis uitgevoerd worden en de bovenstaande aanvullende voorschriften in acht worden genomen.

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 extending to the right.

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

c.c. Dr. ir. B.P. Loos  
Dr. R.C. Zwart

# **Bioluminescentie-experimenten met knaagdieren geïnjecteerd met adenovirale vectoren**

## **COGEM advies CGM/060516-01**

### **Inleiding**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijk risico's voor mens en milieu bij het uitvoeren van zogenaamde bioluminescentie-experimenten bij ratten en muizen. Met behulp van een speciale camera kunnen in deze experimenten muizen- of rattencellen, waarin het luciferasegen tot expressie komt, zichtbaar gemaakt worden.

In één experiment worden de effecten van recombinante adenovirussen op geïnduceerde tumoren bekeken. In het andere experiment wordt de verspreiding van recombinante adenovirussen in (tumordragende) dieren onderzocht. Voorafgaand aan de metingen zullen een groot aantal verschillende genen met behulp van adenovirale vectoren in muizen tot expressie worden gebracht. Het uiteindelijke doel van de experimenten is een verbetering van genterapie bij kankerpatiënten te bewerkstelligen.

De bioluminescentiemetingen zullen plaatsvinden in een DM-II ruimte. De ratten en muizen zijn gehuisvest in filtertopkooien. Tijdens de verplaatsing van de ratten en muizen naar de bioluminescentie apparatuur zullen de dieren onder narcose vervoerd worden in een open container. De aanvrager heeft verzocht deze open handelingen binnen de DM-II ruimte te mogen uitvoeren.

### **Adenovirale vector**

Adenovirale vectoren zijn afgeleid van adenovirussen (*Adenoviridae*, genus *Mastadenovirus*) en worden veelvuldig gebruikt als een effectief genoverdracht-systeem. Er bestaan 51 verschillende serotypes humane adenovirussen, welke geclassificeerd kunnen worden in zes groepen (A tot en met F). Adenovirussen hebben een gastheerbereik dat beperkt is tot één soort of nauw verwante soorten (1-3). Het virus kan de luchtwegen, het maag-darmstelsel en soms ogen infecteren en zich hierin ook repliceren (9).

In de onderhavige adviesvraag wordt groep C serotype 5 adenovirus (hAd5) als basis gebruikt voor de adenovirale vector. Infectie met type 5 adenovirus kan leiden tot verkoudheidsverschijnselen. Bij immuungecompromiteerde patiënten kunnen nier- en longontstekingen ontstaan met eventueel fatale gevolgen.

Adenovirussen bestaan uit een lineair dubbelstrengs DNA molecuul omgeven door een eiwitmantel (1-2). Het genoom van hAd5 is onderverdeeld in een vroege (Early) en een late (Late) regio. De vroege regio komt kort na binnenkomst van het virus in de cel tot expressie. De late regio komt pas tot expressie als de DNA replicatie gestart is.

De vroege regio bevat onder andere het gen *E1*. E1 eiwitten zijn betrokken bij de activering van de overige vroege en late genen en induceren de DNA synthese van de gastheercel. In de gastheercel blokkeert E1 tevens de synthese van eiwitten en induceert het de expressie van virale genen. Bovendien remt E1 apoptose (geprogrammeerde celdood) van de gastheercel (1-2,4).

De aanvrager geeft aan gebruik te willen maken van replicatiedeficiënte adenovirale vectoren. Een kenmerk van deze vectoren is een niet werkende E1-regio waardoor het virus niet meer in staat is om zich te repliceren. Voor de productie van deze vectoren is daarom een helpercellijn vereist. Naast een E1-regio worden soms ook andere 'Early genen' gedeleteerd. Hierdoor verkrijgen de vectoren een verminderde toxiciteit en een langduriger transgenexpressie (8-9)

Naast replicatiedeficiënte vectoren, gebruikt de aanvrager conditioneel-replicerende adenovirussen (CRAds). Deze virussen kunnen zich alleen in een specifiek weefseltype repliceren. De vectoren van deze aanvraag zijn zo geconstrueerd dat ze in principe alleen in de geïnduceerde tumoren kunnen repliceren.

Er zijn verschillende manieren om CRAds te verkrijgen (7). Eén manier is het verwijderen van hele genen of van functionele gengebieden die noodzakelijk zijn voor de replicatie van het virus in normale cellen maar die niet vereist zijn voor de replicatie in tumorcellen (6).

Een andere manier is de virusmantel van het adenovirus zo te modificeren dat specifieke tumorcellen een vergrote capaciteit verkrijgen om adenovirussen op te nemen. Zo kunnen bijvoorbeeld specifieke sequentiemotieven aan het fiber van het adenovirus worden toegevoegd zodat binding met een specifieke receptor en daardoor binnenkomst van het virus in de doelcel kan optreden. Alleen indien het virus de cel kan binnendringen kan het zich repliceren.

De laatste methode richt zich op de constructie van tumor-specifieke promotors in adenovirussen waardoor de expressie van genen die noodzakelijk zijn voor de replicatie (vaak het *E1A*-gen) van het virus beperkt wordt tot de tumorcel (6).

### **De adviesvraag**

De aanvrager is reeds in het bezit van een vergunning om experimenten met muizen en ratten die zijn getransfecteerd met conditioneel-replicerende of replicatiedeficiënte adenovirale vectoren onder DM-II condities uit te voeren (IG 99-035/03). Handelingen met deze dieren zullen derhalve plaatsvinden in een veiligheidskabinet van klasse II en de dieren worden gehuisvest in filtertopkooien.

De aanvrager heeft het voornemen bioluminescentie-experimenten met deze knaagdieren uit te voeren. Hiertoe worden de dieren genarcotiseerd en daarna in een open box verplaatst naar de bioluminescentieapparatuur die zich in de DM-II ruimte bevindt. De COGEM is verzocht te adviseren over deze specifieke handelingen.

### *Gebruikte muizen en ratten*

De knaagdieren in deze studies worden gebruikt om de effecten van verschillende adenovirale vectoren op verschillende tumoren te onderzoeken. Tevens wordt gekeken hoe de adenovirale vector zich door het lichaam van de knaagdieren verspreidt.

Voor het eerste experiment worden muizen of ratten getransplanteerd met humane tumorcellen die voorzien zijn van een *luciferase* gen. Deze tumorcellen worden op verschillende wijzen ingespoten. Door middel van intraveneuze injectie wordt getracht longmetastasen te vormen. Injectie in de schedel resulteert in hersentumoren waar injectie in de lever, levertumoren veroorzaakt. Het *luciferase* gen van de tumorcellen wordt constitutief of induceerbaar tot expressie gebracht. Wanneer het constitutieve expressie betreft zal de CMV promotor, afkomstig van het *Cytomegalovirus*, worden gebruikt. In de experimenten zal een scala aan induceerbare promotors worden toegepast. De vervaardiging van en handelingen met deze tumorcellen is reeds vergund.

Na de tumorvorming zullen humane adenovirale vectoren (conditioneel-replicierend of replicatiedeficiënt) aan de knaagdieren worden toegediend. Dit zal intratumoraal of intraveneus plaatsvinden. Het aantal toe te dienen virusdeeltjes varieert van  $1 \times 10^6$  tot  $1 \times 10^{10}$ . De aanvrager geeft aan dat zowel adenovirussen worden toegediend die geen donorsequenties bevatten als adenovirussen waarin een breed spectrum van donorsequenties (bv. single chain immunoglobulines, therapeutische genen, tumorsuppressorgen of genen coderend voor (delen van) liganden voor celoppervlak moleculen) is ingebracht. Ook de vervaardiging van deze adenovirussen en de injectie van deze vectoren in knaagdieren is vergund.

Voor het tweede experiment waarbij de distributie van de adenovirussen wordt onderzocht worden muizen en ratten gebruikt, al dan niet getransplanteerd met humane tumorcellen. De tumorcellen zijn in dit geval niet genetisch gemodificeerd. De adenovirale vector bevat bij dit experiment een *luciferase* gen zodat het in de bioluminescentieproeven gevolgd kan worden. De toediening bedraagt eveneens  $1 \times 10^6$  tot  $1 \times 10^{10}$  partikels.

### *Bioluminescentie-experiment*

Voorafgaand aan de metingen met de bioluminescentieapparatuur (de zogenaamde imager) worden de dieren in een veiligheidskabinet van klasse II uit hun filtertopkooi gehaald. Dit gebeurt minimaal 24 uur nadat de dieren zijn geïnjecteerd met de adenovirale vector. De dieren worden genarcotiseerd en tevens wordt luciferine reagens door injectie aan het dier toegediend. Dit reagens is nodig om de cellen waar het luciferase gen tot expressie komt, te kunnen waarnemen. Na 20 minuten wordt het dier in een schoon plastic bakje gelegd en naar de lichtdichte kamer van de imager gebracht. De imager bevindt zich in dezelfde DM-II ruimte. Tijdens dit transport is er

sprake van open handelingen omdat het bakje niet wordt afgedekt. De afstand van het veiligheidskabinet naar de imager bedraagt enkele meters. Het dier zal gedurende enkele minuten (maximaal 10) met de imager onderzocht worden.

Na afloop van het experiment wordt het dier weer in de filtertopkooi geplaatst. De aanvrager geeft aan het bakje na afloop van de experimenten te desinfecteren met 0,1% SDS gevolgd door 70 % ethanol.

### **Overweging en advies**

In de onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van zowel replicatiedeficiënte als conditioneel-replicerende adenovirale vectoren. Risico's bij werkzaamheden met dergelijke vectoren hebben betrekking op de eventuele verspreiding van vrije replicatiedeficiënte en conditioneel-replicerende vectordeeltjes en de eventuele aanwezigheid van replicatie competent adenovirus (RCA).

#### *Vrijkomen van vrije vectordeeltjes*

Het is mogelijk dat na toediening van de virale vector, deze vector via excreta van de proefdieren in het milieu, in dit geval in de DM-II ruimte, terecht komt en daar de laboratoriummedewerker infecteert. De mate van uitscheiding hangt af van verschillende factoren zoals de aard van de gebruikte vector, de toegediende dosis en de toedingsvorm (intraveneus of intratumoraal).

Uit klinisch onderzoek is gebleken dat shedding na toediening heel beperkt is. In de meeste gevallen is shedding na 24 uur niet meer aantoonbaar. Soms is vector DNA in neus- en keelholten echter langer aantoonbaar (11).

De aanvrager vraagt een vergunning aan voor experimenten waarbij verschillende vectoren, toedieningsvormen en doses gebruikt worden. Hierdoor is het niet goed te voorspellen of er 24 uur na toediening van de virale vectoren nog uitscheiding zal plaatsvinden. Wel staat vast dat eventuele uitscheiding vele malen lager zal zijn dan de geïnjecteerde dosis.

#### Uitscheiding replicatiedeficiënte vectoren

Een mogelijkheid waardoor de virusdeeltjes het dier kunnen verlaten is via de luchtwegen. Tijdens het transport naar de imager zijn de proefdieren onder narcose. Zij zullen hierdoor rustig ademen en geen onverwachte bewegingen maken. De kans op aërosolvorming is hierdoor minimaal. Indien toch aërosolvorming optreedt, zal de hoeveelheid uitgescheiden vector vele malen lager zijn dan de toegediende dosis.

In het onwaarschijnlijke geval dat de laboratoriummedewerker geïnfecteerd raakt met de vector kan de vector zich, vanwege zijn deficiënte karakter, niet repliceren. Alleen wanneer de medewerker een acute adenovirale infectie ondergaat kan eventueel complementatie van het E1 domein plaatsvinden. In dat geval kan replicatie van de vector optreden. De COGEM is van mening dat de hoeveelheid uitgescheiden

vector van dien aard is dat complementatie van het E1 domein en daarmee replicatie van de vector verwaarloosbaar klein is.

De vector kan zich ook bevinden in de ontlasting van het dier en zo in het milieu vrijkomen. Hoewel de proefdieren tijdens het experiment onder narcose zijn, is het in principe niet uit te sluiten dat er tijdens de handelingen urine of ontlasting vrijkomt. De COGEM acht de kans dat zich hierin infectieus virus bevindt zeer onwaarschijnlijk maar kan dit gezien de aard van de experimenten niet uitsluiten. Derhalve is de COGEM van mening dat de dieren uit voorzorg geplaatst dienen te worden op (zwart) papier dat na afloop van de proef als ggo afval wordt behandeld.

#### Uitscheiding conditioneel-replicerende vectoren

Als conditioneel-replicerende vectoren het dier via de luchtwegen verlaten, kunnen deze virussen zich in principe alleen in tumoren repliceren. Hierbij dient opgemerkt te worden dat het conditioneel-replicerend vermogen waarschijnlijk niet absoluut zal zijn. De COGEM is van mening dat een dergelijk virus zeer sterk geattenuëerd zal zijn waardoor bij infectie geen viraemie zal ontstaan. Eventuele infectie leidt tot replicatie in een zeer beperkt aantal cellen totdat het immuunsysteem de virussen zal vernietigen.

De COGEM acht het zeer onwaarschijnlijk dat na eventuele infectie van een laboratoriummedewerker door een CRAd, complementatie of recombinatie met residente adenovirussen kan optreden. Het replicatievermogen van de CRAds in gezonde personen is zeer minimaal tot afwezig. Hiernaast is het zeer onwaarschijnlijk dat een eventuele recombinant een selectief voordeel verwerft ten opzichte van het residente virus.

De aanvrager heeft aangegeven dat het tropisme van enkele CRAds door insertie van specifieke DNA fragmenten verhoogd is. Dit verhoogde tropisme berust op beïnvloeding van de virale transductie waardoor de mate van infectie van tumorcellen verhoogd wordt. Transductie van vele adenovirussen vereisen de binding van het virus aan de CAR receptor (Coxsackievirus en Adenovirus Receptor) op de targetcel. Wanneer binding heeft plaatsgevonden, vindt een tweede binding plaats tussen specifieke integrines ( $\alpha_v\beta_3$  en  $\alpha_v\beta_5$ ) en het zogenaamde adenovirale RGD-motief. Integrines zijn celreceptoren die interacties tussen de cel en hun omgeving mogelijk maken. Het RGD motief omvat drie aminozuren: arginine, glycine en asparagine.

De expressie van de CAR receptor verschilt van cel tot cel. Wanneer de receptor laag tot expressie komt zal het adenovirus de betreffende cel slecht kunnen infecteren. Wanneer dit het geval is, wordt het effect van de beoogde kanker-therapie sterk gereduceerd. Om deze beperking op te heffen heeft de aanvrager een RGD-motief geïnserteerd in het fiber-eiwit van een CRAd. Door dit RGD-motief vindt een versterkte binding met de integrines plaats met het gevolg dat deze adenovirussen

cellen die weinig of geen CAR tot expressie brengen, effectiever kunnen infecteren dan een wild-type adenovirus.

Dit veranderde tropisme zou kunnen leiden tot een verhoogde infectie efficiëntie van de experimentator. Met name kan dit eventueel leiden tot infectie van de ogen en het ontstaan van ooginfecties. Sommige adenovirussen (met name virussen van de subgroep B en D) kunnen ooginfecties (epidemische keratoconjunctivitis) veroorzaken (9). Waarschijnlijk zijn deze ooginfecties gerelateerd aan het receptorgebruik van de virussen. De virussen die ooginfecties veroorzaken binden aan andere receptoren dan CAR (12). In de oogcellen die geïnfecteerd kunnen raken met een adenovirus, komen  $\alpha_v\beta_3$  en  $\alpha_v\beta_5$  integrines ook voor. De CRAd, met geïnserteerde RGD-motieven, kan hier nu direct aan binden en mogelijk een ooginfectie veroorzaken.

Om een (oog) infectie te voorkomen adviseert de COGEM een aanvullend voorschrift in de beschikking op te nemen waarin vermeld staat dat de laboratoriummedewerkers ten tijde van het experiment een standaard laboratoriumbril en mondkapje (N-95 of hogere specificatie) moeten dragen.

#### *RCA vorming*

RCA vorming zou mogelijk kunnen optreden tijdens de productie van de replicatie deficiënte adenovirale vector en na injectie van de adenovirusvector in proefdieren. Hieronder wordt ingegaan op deze twee situaties.

#### RCA vorming bij de vectorproductie

De aanvrager geeft aan de batches te testen op contaminatie met RCA middels een CPE (cytopatisch effect) assay op A549 cellen (niet-permissief voor de vector). Daarnaast bepaalt de aanvrager de hoeveelheid infectieuze vectordeeltjes (pfu) door middel van een titratie op zogenaamde 911 cellen (wel permissief voor de vector).

De aanvrager geeft aan maximaal  $1 \times 10^8$  virusdeeltjes te kunnen testen omdat anders een directe toxiciteit voor de A549 cellen optreedt. Uitgaande van een partikel/pfu ratio van 10 en een maximale hoeveelheid van  $1 \times 10^8$  vectordeeltjes, ligt de gevoeligheid van de RCA-test op 1 RCA per  $1 \times 10^7$  pfu. Bij een maximale toe te dienen dosis van  $1 \times 10^9$  pfu zouden er dan maximaal 100 RCA aanwezig kunnen zijn.

Met de beschreven test kan derhalve niet voor 100% worden uitgesloten dat er bij toediening van de hoogste doseringen geen RCA in het inoculum aanwezig is. Gezien de aard van de experimenten waarbij een groot scala van verschillende donorsequenties in de vector geïnserteerd kunnen worden, acht de COGEM het van belang dat het gebruikte inoculum vrij is van RCA. Omdat dit niet kan worden uitgesloten is de COGEM van mening dat het dragen van een mondkapje (N-95 of hogere specificatie) en een standaard laboratoriumbril uit voorzorg verplicht moet worden gesteld.



Naast de experimentator is het ook mogelijk dat eventuele RCA's ook andere laboratoriummedewerkers infecteren. De COGEM is van mening dat als zij zich tijdens het experiment in dezelfde ruimte bevinden als de experimentator, zij ook een bril en een mondkapje moeten dragen.

#### RCA vorming in proefdieren

De kans op RCA vorming door recombinitie en mobilisatie van muizen adenovirussen met de replicatiedeficiënte vectoren, na injectie van de adenovirale vector in proefdieren, is verwaarloosbaar klein. RCA's kunnen alleen gevormd worden als de proefdieren geïnfecteerd zijn met muizen adenovirussen. Volgens geraadpleegde deskundigen is het nagenoeg uitgesloten dat geregistreerde proefdiercentra in Nederland dieren leveren welke geïnfecteerd zijn met muizen adenovirussen (5). De centra volgen de aanbevelingen van de Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) over micro-organismen en virussen die aanwezig mogen zijn in proefdieren. Dit orgaan stelt dat proefdieren onder andere vrij moeten zijn van muizen adenovirussen. Om hiervoor zorg te dragen vindt regelmatig screening op aanwezigheid van adenovirussen bij proefdieren plaats.

Indien in het onwaarschijnlijke geval toch dieren besmet zijn geraakt met muizen adenovirussen dan is de COGEM van mening dat de kans op recombinitie zeer klein is. De sequentie homologie tussen muizen adenovirussen en humane adenovirussen is laag. Indien onverhoopt toch recombinitie optreedt, acht de COGEM de kans dat het *E1* gen uit het muizen adenovirus op de juiste plaats in de vector wordt ingebouwd én daardoor een replicatiecompetent virus met het transgen ontstaat, verwaarloosbaar klein.

#### *Desinfectie*

De aanvrager geeft aan het bakje waarin het proefdier zich heeft bevonden na de bioluminescentie-metingen te desinfecteren met 0,1 % SDS gevolgd door 70% ethanol. De COGEM acht deze methode adequaat om de eventueel aanwezige adenovirusvectoren te inactiveren.

#### *Advies*

Concluderend is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu bij het uitvoeren van de bioluminescentie-experimenten verwaarloosbaar klein zijn, mits de laboratoriummedewerkers naast de op DM-II geldende kledingvoorschriften, een mondkapje (N-95 of hogere specificatie) en een standaard laboratoriumbril dragen.

## Referenties

1. McConnell, M.J. en Imperiale, M.J. (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 15:1022-1033
2. Knipe DM and Howley PM (2001). *Fields virology*, volume two, fourth edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
3. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
4. Nichols, W.W., Lardenoije, R., Ledwith, B.J. et al. (2002). Propagation of adenoviral vectors: use of PER.C6 cells. In: *Adenoviral vectors for gene therapy*. Academic Press, San Diego, USA.
5. Geraadpleegde deskundige: Jan-Bas Prins, Universiteit Leiden (maart 2006).
6. Sonabend A.M. *et al.* (2006). Conditionally replicative adenoviral vectors for malignant glioma. *Reviews medical virology* 16: 99-115
7. Kirn D. *et al.* (2001). Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. *Nature medicine* 7: 781-787
8. Zhang W.W. (1999). Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer gene therapy* 6: 113-138
9. Vorburger S.A. en Hunt K.K. (2002). Adenoviral gene therapy. *Oncologist* 7: 46-59
10. Knipe D.M. en Howley P.M. (2001). *Fields of Virology*, fourth edition. Lippincott Willams & Wilkins.
11. COGEM (2006). Inventarisatie van sheddingdata en analyses: mogelijkheden voor standaardisering. COGEM onderzoeksrapport 2006-04 (ter perse)
12. Wu E. *et al.* (2001). A 50-kDa membrane protein mediates sialic acid-independent binding and infection of conjunctival cells by adenovirus type 37. *Virology* 279: 78-89