

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
dhr. J. J. Atsma
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 24 oktober 2012
KENMERK CGM/121024-01
ONDERWERP Advies: moleculaire karakterisering kippenvaccin Innovax-ILT

Geachte heer Atsma,


Naar aanleiding van aanvullende informatie betreffende een vergunningaanvraag inzake de introductie in het milieu van het kippenvaccin Innovax-ILT van Intervet International B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

Eerder dit jaar heeft de COGEM adviezen uitgebracht over een vergunningaanvraag voor een veldstudie met het recombinant kippenvaccin Innovax-ILT. Innovax-ILT is ontwikkeld om pluimvee te beschermen tegen infectieuze laryngotracheïtis (ILT) en de ziekte van Marek. De geconstrueerde vaccinstam wordt in het buitenland, maar niet in de EU, op de markt gebracht. Van het vaccin zijn in de periode 2007-2010 meer dan 1,1 miljard doses verkocht. Gedurende deze periode zijn geen schadelijke effecten van het vaccin gerapporteerd.

In de COGEM adviezen werd geconcludeerd dat, hoewel de risico's voor mens en milieu bij deze studie onder de voorgenomen werkvoorschriften vermoedelijk verwaarloosbaar klein zijn, het dossier onvolledig was ondermeer omdat relevante experimentele gegevens betreffende de moleculaire karakterisering ontbraken. Bij de introductie in het milieu van een genetisch gemodificeerd organisme (ggo) acht de COGEM het voor de milieurisicoanalyse van belang dat de genetische samenstelling van het ggo in voldoende detail experimenteel is gekarakteriseerd en dat bewijs hiervan wordt overlegd. Op basis van deze informatie kan vastgesteld worden of het ggo overeenkomt met zijn theoretische beschrijving.

De aanvrager heeft nieuwe gegevens met betrekking tot de moleculaire karakterisering aangeleverd. Met deze en eerder overlegde gegevens is de COGEM van mening dat er voldoende experimenteel bewijs is aangeleverd om vast te kunnen stellen dat de genetische samenstelling van de HVT/ILT-138 voldoet aan zijn theoretische beschrijving en dat het ggo genetisch stabiel is. De COGEM acht hiermee haar eerder gemaakte bezwaren weggenomen en is op basis van alle aangeleverde data van mening dat de milieurisico's bij het uitvoeren van de voorgenomen veldstudie met Innovax-ILT verwaarloosbaar klein zijn.



Dit advies bevat vertrouwelijke informatie en zal derhalve niet gepubliceerd of op een andere wijze openbaar gemaakt worden.¹ De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



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

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau GGO
Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

¹ Op 18 januari 2013 is de COGEM op de hoogte gesteld dat de betreffende informatie niet langer als vertrouwelijk wordt aangemerkt en openbaar is gemaakt. Hierdoor vervalt het behoud van de COGEM aangaande publicatie van het advies.

Aanvullende informatie betreffende de moleculaire karakterisering van recombinant kippenvaccin Innovax-ILT

COGEM advies CGM/121024-01

Inleiding

Eerder dit jaar heeft de COGEM twee maal advies uitgebracht over een vergunningaanvraag voor een veldstudie met het recombinant kippenvaccin Innovax-ILT.^{1,2} De vergunningaanvraag was ingediend door Intervet International BV (MSD). In de adviezen werd geconcludeerd dat, hoewel de risico's voor mens en milieu bij deze studie onder de voorgenomen werkvoorschriften vermoedelijk verwaarloosbaar klein zijn, het dossier onvolledig was ondermeer omdat relevante experimentele gegevens betreffende de moleculaire karakterisering ontbraken. Daardoor was er onvoldoende onderbouwing aanwezig op grond waarvan een conclusie getrokken kon worden over de milieuveiligheid van het vaccin.

De aanvrager heeft nieuwe gegevens met betrekking tot de moleculaire karakterisering aangeleverd. Deze zijn ter beoordeling aan de COGEM voorgelegd. De informatie beschrijft op welke wijze de vaccinstam tot stand is gekomen en laat resultaten zien van nieuwe Southern blot experimenten. Tevens is een nieuwe weergave van een 'reverse transcription' (RT) PCR analyse aangeleverd.

De aanvullende informatie betreft een aantal studies die vertrouwelijke informatie bevatten. De COGEM acht deze vertrouwelijk gegevens van belang om haar advies te onderbouwen. Daarom zal dit advies niet gepubliceerd of op andere wijze openbaar gemaakt worden.¹

Innovax-ILT

Innovax-ILT is ontwikkeld om pluimvee te beschermen tegen infectieuze laryngotracheïtis (ILT) en de ziekte van Marek. Het vaccin heeft het apathogene *Meleagrid herpesvirus 1*, ook bekend onder de naam Herpesvirus of turkeys (HVT), als basis.³ Infecties met HVT bieden kruisbescherming tegen infecties met *Gallid herpes virus 2* (ook bekend onder de naam Marek's disease virus (MDV)).³ In de HVT stam FC126 zijn de expressiecassettes van de glycoproteïnen gD en gI van het *Gallid herpesvirus 1* (ook bekend onder de naam 'Infectious laryngotracheïtis virus' (ILTV)) gekloneerd.³ Het insert is geïntegreerd in een 'open reading frame' (ORF) met

¹ Op 18 januari 2013 is de COGEM op de hoogte gesteld dat de betreffende informatie niet langer als vertrouwelijk wordt aangemerkt en openbaar is gemaakt. Hierdoor vervalt het behoud van de COGEM aangaande publicatie van het advies.

onbekende functie. De geconstrueerde vaccinstam heet HVT/ILT-138 en wordt onder de naam Innovax-ILT in het buitenland, maar niet in de EU, op de markt gebracht. Van het vaccin zijn in de periode 2007-2010 meer dan 1,1 miljard doses verkocht. Gedurende deze periode zijn geen schadelijke effecten van het vaccin gerapporteerd.

Eerder COGEM advies

In haar eerste advies betreffende Innovax-ILT wees de COGEM erop dat de aanvrager geen experimentele gegevens had aangeleverd die bevestigden dat de genetische samenstelling van HVT/ILT-138 overeenkomt met zijn theoretische beschrijving. Daarnaast kon zij het 'Periodic Safety Update Report' niet verifiëren omdat een essentieel onderdeel ervan ontbrak.¹ Zij kon daarom niet tot een definitief eindoordeel komen.

Naar aanleiding van het eerste advies leverde de aanvrager aanvullende informatie aan, welke ter beoordeling aan de COGEM werd voorgelegd. De informatie bestond ondermeer uit een sequentieanalyse van de geïnsereerde gD/gI expressie-cassette en flankerende sequenties. Door het ontbreken van informatie over de wijze waarop het HVT/ILT-138 is geconstrueerd, kon de COGEM echter niet herleiden of de flankerende sequenties ook aanwezig zijn in het donorconstruct of daadwerkelijk tot in het genoom van het acceptorvirus reikten. Hierdoor was het niet mogelijk te beoordelen of de geleverde sequentie-informatie bewijs vormde voor de insertie van de ILT expressiecassette op de beoogde locatie in het FC126 genoom.²

De COGEM merkte hierbij op dat indien het genetisch gemodificeerde organisme (ggo) geconstrueerd is door middel van homologe recombinatie tussen een donorplasmide en het virale genoom, kennis over de sequentie en lengte van de flankerende armen van de gD/gI sequenties in het donorconstruct inzichtelijk zou maken wat de beoogde recombinatiesequentie in het FC126-genoom is geweest. Bovendien merkte zij op dat de aangeleverde sequentiegegevens wel voldoende zouden zijn geweest als aan de hand van een Southern blot analyse vastgesteld kon worden dat het insert daadwerkelijk geïntegreerd was op de beoogde locatie. Wegens de kwaliteit van de aangeleverde blot was dit echter niet mogelijk.

Tevens kon aan de hand van de Southern blot analyse en een RT-PCR analyse niet vastgesteld worden of HVT/ILT 138 genetisch stabiel is. Daarnaast gaf de Southern blot analyse ook geen uitsluitsel of er, afgezien van het beoogde insert, andere sequenties van de toegepaste gD/gI donorvector in het construct geïnsereerd waren. De COGEM wees erop dat Southern blot analyses, waarbij verschillende 'restrictie-enzymen' en verschillende (vector)specifieke 'probes' gebruikt worden, uitsluitsel kunnen geven over de insertielocatie, de genetische stabiliteit van het construct en de aanwezigheid van vectorspecifieke sequenties.

Overweging

Bij de introductie in het milieu van een ggo acht de COGEM het voor de milieurisicoanalyse van belang dat de genetische samenstelling van het ggo in voldoende detail experimenteel is gekarakteriseerd en dat bewijs hiervan wordt overlegd. Op basis van deze informatie kan vastgesteld worden of het ggo overeenkomt met zijn theoretische beschrijving. Bij een dergelijke moleculaire karakterisering wordt onder meer vastgesteld op welke locatie het insert is

geïntegreerd, hoeveel kopieën van het insert aanwezig zijn, of er naast de ingebrachte eigenschap al dan niet herschikkingen van het virale genoom hebben plaatsgevonden, en of er andere sequenties (zoals fragmenten van de bij de constructie toegepaste gD/gI donorvector of voor de selectie gebruikte resistentiegenen) onbedoeld zijn geïnsereerd.

Bewijs kan bestaan uit een volledige genoomsequentie, aan de hand waarvan het ggo en uitgangsorganisme met elkaar vergeleken kunnen worden. Ook een gedetailleerde analyse van restrictiepatronen van het genoom van het ggo waaruit blijkt dat het genoom met uitzondering van de beoogde inserties identiek is aan het genoom van het uitgangsorganisme, en waarbij tevens omschreven wordt hoe de constructie heeft plaatsgevonden en aangegeven wordt of er al dan niet onbedoelde bijproducten zouden kunnen ontstaan, kan bewijs vormen.

Naar aanleiding van het tweede COGEM advies heeft de aanvrager informatie aangeleverd over de wijze waarop HVT/ILT-138 is geconstrueerd. Aan de hand van vijf cosmiden, samengesteld uit overlappende subgenomische fragmenten van de virusstam FC126, is door middel van cotransfectie en homologe recombinatie in kippenembryo fibroblasten FC126 gegenereerd. De gebruikte methode is eerder beschreven voor het "Pseudorabiesvirus".⁴ Voor het genereren van virusstam HVT/ILT-138 is eenzelfde methode gebruikt. De cotransfectie omvatte in dit geval echter zeven subgenomische fragmenten. Vier waren hetzelfde als bovengenoemde cosmiden. De overige drie waren een homologievector en twee zogenaamde 'cosmide subklonen' die na homologe recombinatie resulteerde in het ggo specifiek cosmide. De homologievector bestaat uit het pNEB193 plasmide waarin het gD/gI insert van ILTV is gekloneerd.

In reactie op de onduidelijkheid over de reikwijdte van de eerder overlegde sequentieanalyse heeft de aanvrager tevens aangegeven welk gebied van het ggo precies is gesequenced. Deze sequentie start 'upstream' van de insertiesite in het genoom van het acceptorvirus (FC126), en beslaat de gehele linker recombinatiesequentie tot en met de gD/gI expressiecassette. De rechter recombinatiesequentie en in het deel downstream van de insertiesite is niet gesequenced. Uit deze informatie kan de COGEM afleiden dat de insertie van de ILT expressiecassette op de beoogde locatie in het FC126 genoom terecht is gekomen.

Naar aanleiding van het tweede COGEM advies heeft de aanvrager ook verscheidene nieuwe Southern blot analyses uitgevoerd. Hiervoor is gebruik gemaakt van viraal DNA van zowel het FC126 als het HVT/ILT-138 virus, van verschillende 'restrictie-enzymen' en van verschillende 'probes'. De resultaten van deze analyses zijn door de aanvrager overlegd.

Op grond van de resultaten van deze Southern blot analyses in combinatie met de eerder aangeleverde gegevens concludeert de COGEM dat één kopie van de gD/gI expressiecassette in de juiste oriëntatie op de beoogde locatie is geïntegreerd, en dat geen pNEB193 vectorsequenties aanwezig zijn.

De aanvrager stelt dat de aangeleverde verbeterde weergave van de RT-PCR analyse bevestigt dat gD/gI expressie in HVT/ILT-138 na vijf passages *in vitro* en *in vivo* stabiel is. Tevens stelt de aanvrager dat de genen voor gD en gI stabiel in het HVT/ILT-138 genoom zijn geïntegreerd op

basis van het feit dat aminozuursequentie van deze genen na 10 *in vitro* passages identiek zijn aan de corresponderende sequenties in de oorspronkelijk stock van HVT/ILT-138.

De COGEM is van mening dat op grond van de RT-PCR, de sequentieanalyses en de nieuwe aanvullende Southern blot data, waarbij virus is gebruikt dat diverse celpassages heeft ondergaan, de genetische stabiliteit van HVT/ILT-138 in voldoende mate is aangetoond.

Conclusie

Op grond van de nieuwe en eerder aangeleverde gegevens is de COGEM van mening dat er voldoende experimenteel bewijs is overlegd om vast te kunnen stellen dat de genetische samenstelling van de HVT/ILT-138 voldoet aan zijn theoretische beschrijving. Bovendien is zij op grond van deze gegevens van mening dat het gg-virus genetisch stabiel is. Hiermee zijn de eerder gemaakte bezwaren weggenomen. De COGEM is daarom van mening dat de milieurisico's bij het uitvoeren van de voorgenomen veldstudie met Innovax-ILT verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. COGEM (2012). Introductie in het milieu van een recombinant herpesvirus vaccin tegen laryngotracheïtis en de ziekte van Marek. COGEM advies CGM/120611-01
2. COGEM (2012). Aanvullende informatie betreffende een kippenvaccin tegen infectieuze laryngotracheïtis en de ziekte van Marek. COGEM advies CGM/120718-01 (VERTROUWELIJK)
3. King AMQ *et al.* (editors) (2012). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Elsevier Academic Press
4. Van Zijl M *et al.* (1998). Regeneration of herpesviruses from molecularly cloned subgenomic fragments. J of Virology 62(6): 2191-2195