

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw W.J. Mansveld  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

TEL.: 030 274 2777  
FAX: 030 274 4476  
INFO@COGEM.NET  
WWW.COGEM.NET

**DATUM** 22 november 2012  
**KENMERK** CGM/121122-02  
**ONDERWERP** Advies: Inschaling werkzaamheden met gg-AAV i.c.m. muizen

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een verzoek tot wijziging van de vergunning 'Het bestuderen van de functie van eiwitten (o.a. CRB1, CRB1-interacterende eiwitten, MRP6) die betrokken zijn bij oogaandoeningen m.b.v. knock-out muizen, transgene muizen, eukaryote cellijnen en retrovirale- en AAV-cDNA expressie vectoren' van het Nederlands Instituut voor Neurowetenschappen, deelt de COGEM u het volgende mee.

#### **Samenvatting**

De COGEM is verzocht te adviseren over een wijzigingsverzoek van een vergunning voor onderzoek naar de mogelijkheden van genterapie om oogaandoeningen te voorkomen. Hiervoor wil de aanvrager het netvlies van muizen infecteren met niet-replicerende genetisch gemodificeerde virusdeeltjes, die gebaseerd zijn op het 'adeno-associated virus' (AAV).

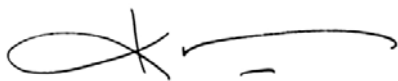
AAV is een virus dat mensen kan infecteren, maar geen ziekte veroorzaakt. Het virus kan alleen repliceren als er co-infectie plaatsvindt van de geïnfecteerde cel met een helpervirus. Het gg-AAV mist bovendien enkele relevante genen, waardoor voor replicatie niet alleen een helpervirus, maar ook een *wildtype* AAV nodig is.

De aanvrager heeft al een vergunning om dit onderzoek op DM-II inperkingsniveau uit te voeren. Hierbij wordt het gg-AAV in een veiligheidskabinet klasse II aan de muizen toegediend. Op basis van een eerder uitgebracht COGEM advies over het gebruik van gg-AAV in knaagdieren verzoekt de aanvrager de toediening van het gg-AAV buiten het veiligheidskabinet te mogen uitvoeren en de dieren zeven dagen na injectie op D-I niveau te mogen huisvesten.

Aërosolvorming kan ten tijde van de injectie van de muizen niet geheel worden uitgesloten. Onder navolging van enkele aanvullende werkvoorschriften acht de COGEM het risico van toediening van betreffende gg-AAV vectoren buiten het veiligheidskabinet klasse 2 echter verwaarloosbaar klein en kan zij ermee instemmen dat deze handelingen buiten het veiligheidskabinet plaatsvinden. De aanvrager laat zien dat er zeven dagen na injectie geen gg-AAV in het bloed van de muizen aanwezig is. Mede op basis van deze gegevens acht de COGEM de milieurisico's verwaarloosbaar klein als de muizen zeven dagen na de behandeling op D-I inperkingsniveau worden gehuisvest.

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

# Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd AAV in muizen

## COGEM advies CGM/121122-02

### Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een wijzigingsaanvraag van de vergunning IG 00-214 met de titel 'Het bestuderen van de functie van eiwitten (o.a. CRB1, CRB1-interacterende eiwitten, MRP6) die betrokken zijn bij oogaandoeningen m.b.v. knock-out muizen, transgene muizen, eukaryote cellijnen en retrovirale- en AAV-cDNA expressie vectoren' van het Nederlands Instituut voor Neurowetenschappen. Binnen dit project wordt onderzocht of expressie van onder andere CRB1 in het netvlies van een muizenmodel het verlies van gezichtsvermogen kan voorkomen. Daarvoor wordt gebruik gemaakt van virale transductiesystemen waaronder vectoren gebaseerd op adeno-associated virus (AAV). Deze AAV vectoren zijn replicatie-deficiënt en worden in het oog van de muizen geïnjecteerd. Dit onderzoek is vergund op DM-II inperkingsniveau en open handelingen (zoals de injecties in het oog) dienen in een veiligheidskabinet klasse II uitgevoerd te worden. De aanvrager verzoekt in de wijzigingsaanvraag de injectie buiten het veiligheidskabinet op DM-II inperkingsniveau uit te mogen voeren en de muizen 7 dagen na de injectie te mogen huisvesten op D-I inperkingsniveau.

### *Adeno-associated virus*

AAV behoort tot de familie *Parvoviridae* en het genus *Dependovirus*. Het is een enkelstrengs DNA virus met een genoom van circa 4,7 kb. Het genoom codeert voor twee genen, *rep* en *cap*. Het *rep* gen codeert voor eiwitten die een rol spelen bij de virusreplicatie, de expressie van de structurele eiwitten en de integratie van het virusgenoom in het genoom van de gastheer. Het *cap* gen codeert voor de structurele eiwitten die de virusmantel vormen. De *rep* en *cap* genen worden geflankeerd door twee 'inverted terminal repeats' (ITR's), die zijn betrokken bij DNA-replicatie en integratie van het DNA in een chromosoom van de gastheer. Voor succesvolle replicatie van AAV is co-infectie van een helpervirus nodig, zoals een adenovirus of een herpesvirus.<sup>1,2,3</sup> Als er geen ander virus in de cel aanwezig is, blijft AAV latent in de celkern aanwezig, in afwachting van infectie door een helpervirus.

AAV kan verschillende warmbloedige dieren, inclusief de mens, infecteren.<sup>1</sup> Er zijn verschillende serotypen van AAV bekend welke onder andere verschil vertonen in gastheerspecificiteit en weefseltropisme.<sup>2,4</sup> Infecties met AAV komen wereldwijd en frequent voor (80% van de humane populatie is seropositief voor AAV2), maar gaan voor zover bekend niet gepaard met ziekteverschijnselen.<sup>5</sup> Overdracht van het virus vindt waarschijnlijk plaats via de respiratoire of gastro-intestinale route.<sup>1</sup>

### *Productiesysteem van replicatie-deficiënte AAV-deeltjes*

Voor het beschreven onderzoek zal de aanvrager gebruik maken van vier verschillende replicatie-deficiënte AAV-deeltjes die de manteleiwitten van hetzij AAV serotype 5, serotype 6,

serotype ShH10 of serotype ShH10Y445F bevatten. De laatste twee serotypen zijn afgeleid van serotype 6 en bevatten ten opzichte van dit serotype een aantal puntmutaties in *cap* gen dat voor de mantelwitte codeert. Ieder serotype infecteert een verschillende set van celtypen in het netvlies van het oog. Het AAV serotype 5 infecteert voornamelijk fotoreceptoren en retinale pigment epitheelcellen en AAV serotype 6 infecteert voornamelijk Müller glia cellen en ganglioncellen. Door de aangebrachte puntmutaties infecteren het AAV serotype ShH10 en ShH10Y de Müller glia cellen efficiënter dan serotype 6.

De viruspartikels worden geproduceerd met behulp van een productiesysteem dat gebaseerd is op de co-transfectie van verschillende plasmiden in HEK 293T cellen. Voor de productie van gg-AAV serotype 5 en serotype 6 is transfectie van plasmide pAAV en respectievelijk packaging/ helperplasmide pDP5 en pDP6 nodig. Het plasmide pAAV bevat de ITR's, de te expresseren genen van interesse en/of een 'green fluorescent protein' (GFP) sequentie onder controle van een CMV promotor, fotoreceptor-specifieke of Müller glia-specifieke promotor. Het helperplasmide pDP5 en pDP6 bevat de voor de productie benodigde *rep* en *cap* genen en de adenovirus type 5 helperfuncties VA, E2A en E4.

Het packaging/helperplasmide dat gebruikt wordt voor de productie van gg-AAV serotype ShH10 en serotype ShH10Y445F mist deze adenovirus helperfuncties. Daarom wordt voor de productie van deze serotypen nog een vierde plasmide, het zogenaamde plasmide pHelper ge-co-transfecteerd dat deze adenovirus helperfuncties levert.

### **Eerder advies**

De COGEM heeft eerder geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met gg-AAV vectoren in combinatie met knaagdieren. In 2002 heeft de COGEM positief geadviseerd over een verzoek om AAV2 vectoren buiten het veiligheidskabinet klasse II in de hersenen van ratten te mogen injecteren.<sup>6</sup> Hoewel de COGEM van mening was dat aërosolvorming en verspreiding van het gg-AAV niet geheel uitgesloten kon worden, achtte zij door de aard van de vector en de verwaarloosbaar kleine kans op de aanwezigheid van replicatie-competent gg-AAV het onwaarschijnlijk dat de veiligheid van mens en milieu in het geding was. Om ook gedurende het experiment de kans op het ontstaan van replicatie-competent AAV te minimaliseren, adviseerde zij de volgende aanvullende voorschriften:

- gedurende de werkzaamheden dienen de medewerkers een neus- en mondkapje te dragen
- aërosolvorming moet zoveel mogelijk worden voorkomen
- de ratten dienen direct na injectie in filtertopkooien geplaatst te worden
- de DM-II ruimte moet tijdens de handelingen afgesloten zijn

De geïnjecteerde dieren waren conform de inschaling van AAV gehuisvest op DM-II inperkingsniveau. De aanvrager verzocht de dieren een week na injectie op D-I niveau te mogen huisvesten, als de aanwezigheid van AAV deeltjes na deze periode niet meer aangetoond kon worden. De COGEM achtte het risico van deze omlaagschaling verwaarloosbaar klein op basis van het feit dat de vector replicatie-deficiënt is en de aangeleverde PCR resultaten waaruit kon worden afgeleid dat een week na injectie de hoeveelheid vector minimaal is.

In 2009 heeft de COGEM advies uitgebracht over een verzoek van diezelfde aanvrager om de PCR test voorafgaand aan de terugplaatsing naar D-I inperkingsniveau van muizen en ratten die met AAV1 geïnjecteerd werden, achterwege te mogen laten.<sup>7</sup> Op basis van de gegevens van de aanvrager en aanvullende literatuur bleek AAV in bloed van ratten en muizen snel afgebroken te worden ( $t_{1/2}$  ca. 1 uur). Tevens kon de aanvrager 1 uur na injectie van AAV in de hersenen van deze dieren geen virus detecteren in de bloedbaan. Op basis van deze gegevens achtte de COGEM de PCR test overbodig en adviseerde zij positief over het wijzigingsverzoek.

### **Overweging en advies**

#### *Inschaling van de injectie van het gg-AAV in muizen*

De aanvrager claimt dat de geproduceerde gg-AAVs vrij zijn van wildtype AAV en van helpervirussen zoals adenovirussen en herpesvirussen. Tevens geeft de aanvrager aan dat de te gebruiken muizen vrij zijn van wildtype AAV en van helpervirussen. Op basis van de afwezigheid van sequentieoverlap tussen de verschillende plasmiden en de langdurige ervaring met het beschreven productiesysteem acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat gedurende de productie replicatie-competent AAV zal ontstaan door recombinitie gebeurtenissen tussen de benodigde plasmiden. Zij wijst daarbij op het belang dat de productiecellen vrij zijn van wildtype AAV en helpervirussen. Door de afwezigheid van wildtype AAV en helpervirussen in de muis is de COGEM bovendien van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is, dat complementatie of recombinitie gebeurtenissen in het proefdier zal leiden tot replicatie van het gg-AAV.

Conform haar eerdere advies is de COGEM van mening dat bij de injectie van proefdieren aërosolvorming niet geheel kan worden uitgesloten. De uitkomst van de risicobeoordeling met betrekking tot het injecteren van gg-AAV buiten het veiligheidskabinet is derhalve afhankelijk van het mogelijke nadelig effect, dat het gg-AAV heeft voor de medewerker of het milieu als het door aërosolvorming in het DM-II laboratorium vrijkomt. Zoals boven aangegeven, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er replicatie-competent AAV in de dosis aanwezig is.

Voor replicatie van de gg-AAV vector in de medewerker moeten cellen geïnfecteerd zijn door gg-AAV, wildtype AAV en een helpervirus. De COGEM acht de kans verwaarloosbaar klein dat betreffende medewerker op hetzelfde moment geïnfecteerd is door zowel een wildtype AAV als een helpervirus en diezelfde cellen ook geïnfecteerd worden door gg-AAV.

De COGEM acht de kans klein dat de luchtwegen van een medewerker als gevolg van aërosolvorming getransduceerd worden door gg-AAV-deeltjes, maar zij kan dat niet geheel uitsluiten. Zij wijst daarbij op het onderzoek van Zabner *et al.*,<sup>8</sup> en Halbert *et al.*,<sup>9</sup> waaruit blijkt dat AAV serotype 5 en 6 luchtwegepitheel efficiënter transduceren dan AAV serotype 2. In theorie zouden ook de ogen van de medewerker getransduceerd kunnen worden ten gevolge van aerosolvorming. Aangezien de injectie met behulp van een microscoop uitgevoerd wordt, worden de ogen van de medewerker afgeschermd. Hierdoor acht de COGEM de kans op transductie van de ogen verwaarloosbaar klein.

Gezien de aard van de donorsequenties die de gg-AAV deeltjes kunnen bevatten, acht de COGEM de kans bovendien zeer klein dat medewerkers tengevolge van een eventuele infectie nadelige gevolgen zal ondervinden.

Om de risico's van bovenstaande aspecten te minimaliseren adviseert de COGEM de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- de afwezigheid van wildtype AAV, wildtype adenovirus en andere helpervirussen in het productiesysteem is verzekerd door analyse van de te gebruiken productiecellen.
- de injectiespuit is gevuld in veiligheidskabinet van klasse II
- de vorming van aërosolen wordt zoveel mogelijk voorkomen door het in acht nemen van GLP-richtlijnen
- het dragen van een mond- en neuskapje is verplicht

Als de beschreven gg-AAV vectoren op DM-II inperkingsniveau buiten het veiligheidskabinet worden toegediend en daarbij bovenstaande werkvoorschriften worden nageleefd, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

#### *Inperkingsniveau voor huisvesting van gg-AAV geïnjecteerde muizen*

De aanvrager verzoekt de muizen 7 dagen na de behandeling met de gg-AAV vectoren over te mogen brengen naar D-I inperkingsniveau. Ter onderbouwing van zijn verzoek heeft de aanvrager 7 dagen na injectie van  $10^9$  genomische kopieën gg-AAV serum- en urinemonsters van de behandelde muizen verzameld en geanalyseerd met behulp van kwantitatieve PCR. In geen van de monsters werd het gg-AAV aangetoond. In een studie door Zincarelli *et al.* is de farmacokinetiek van een aantal AAV serotypen, waaronder AAV serotype 6 in het bloed van muizen bestudeerd.<sup>4</sup> Een uur na injectie van AAV6 was de initiële dosis ( $1 \times 10^{11}$  virale genomen) gereduceerd tot 4,4% en na 48 uur kon nog slechts 0,05% van de initiële dosis in het bloed worden aangetoond. Op basis van de reductie na 48 uur kan voor AAV6 een halfwaardetijd worden berekend van 4,4 uur. Uitgaande van deze halfwaardetijd kan worden afgeleid dat van een directe injectie van  $10^9$  genomische kopieën AAV6 in de bloedbaan van een muis na 7 dagen minder dan één kopie overblijft.

De COGEM merkt op dat in de studie van Zincarelli *et al.* de farmacokinetiek van AAV5 niet is onderzocht.<sup>4</sup> Op basis van de huidige wetenschappelijk literatuur is de COGEM niet bekend met de eventuele invloed van de aangebrachte mutaties in het *cap* gen van AAV6 op de kinetiek van betreffende gg-AAV vectoren in het bloed. Op basis van zijn ervaring met intraoculaire toediening van AAV in meer dan 100 muizen geeft de aanvrager aan dat biodistributie vanuit het netvlies van de muis naar de bloedbaan nog nooit is aangetoond. Bovendien zal eventueel aanwezig AAV effectief uit het bloed worden verwijderd door milt en lever. Dit blijkt ook uit de door de aanvrager aangeleverde kwantitatieve PCR data van serum- en urinemonsters van behandelde muizen. In geen van de monsters werd 7 dagen na injectie gg-AAV5, gg-AAVshH10 of gg-AAVshH10Y445F gedetecteerd.

Op basis van bovenstaande is de COGEM van mening dat de veiligheid van mens en milieu gewaarborgd is als de muizen 7 dagen na intraoculaire injectie van maximaal  $10^9$  genomische

kopieën van beschreven gg-AAV vectoren op D-I inperkingsniveau worden gehuisvest. De COGEM acht het in deze situatie niet nodig dat de afwezigheid van gg-AAV in het bloed wordt bevestigd door een PCR analyse.

Voor doses, die groter zijn dan  $10^9$  genomische kopieën, is de COGEM van mening dat de afwezigheid van het gg-AAV in het bloed met behulp van PCR moet worden bevestigd, voordat de betreffende muizen teruggeplaatst mogen worden naar inperkingsniveau D-I. Indien dit voor een hogere dosis reproduceerbaar is aangetoond, is de COGEM van mening dat de PCR analyse voor vergelijkbare vervolproeven met deze dosis achterwege kan blijven.

### **Conclusie**

Op basis van bovenstaande is de COGEM van mening dat de veiligheid van mens en milieu voldoende wordt gewaarborgd als de injectie van beschreven gg-AAV vectoren op DM-II inperkingsniveau onder navolging van enkele hierboven gespecificeerde aanvullende werkvoorschriften wordt uitgevoerd. Als maximaal een dosis van  $10^9$  genomische kopieën in het oog van de muizen wordt geïnjecteerd, is de COGEM van mening dat de muizen 7 dagen na toediening zonder aanvullende voorwaarden op D-I inperkingsniveau gehuisvest kunnen worden. Als de maximale dosis wordt overschreden, is de COGEM van mening dat het bloed van de muizen gecontroleerd moet worden op de aanwezigheid van gg-AAV alvorens de dieren overgeplaatst mogen worden naar D-I inperkingsniveau.

### **Referenties**

1. Muzyczka N en Berns KI (2001). *Parvoviridae: The viruses and their replication*. In: Fields virology, volume 2, fourth edition. Edited by Knipe DM en Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia 2333-2359
2. Tijssen P *et al.* (2012). Family *Parvoviridae* In: Virus Taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Edited by King AMQ *et al.* Academic Press, San Diego 405-425
3. Smith-Arica JR en Bartlett JS (2001). Gene therapy: recombinant adeno-associated virus vectors. *Current cardiology reports* 3: 43-49
4. Zincarelli C *et al.* (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* 16:1073-1080
5. Gonçalves MA (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology J.* doi:10.1186/1743-422X-2-43
6. COGEM (2002). Manipulatie van signaaltransductie in de hersenen. COGEM advies CGM/020319-01
7. COGEM (2009). *In vivo* experimenten met een vector gebaseerd op adeno-associated virus. COGEM advies CGM/091130-05
8. Zabner J *et al.* (2000). Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J. Virol.* 74:3852-3858
9. Halbert CL *et al.* (2001). Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared with that of AAV2 vectors. *J. Virol.* 75:6615-6624