

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

DATUM 02 september 2013
KENMERK CGM/130902-01
ONDERWERP Advies: Inschaling in vivo werkzaamheden met gg-CAdV

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een aanvraag tot wijziging van vergunning IG 00-114 met de titel 'Manipulatie van signaaltransductie in de hersenen' van het Universitair Medisch Centrum Utrecht, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting

De COGEM is verzocht te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met ratten en muizen die geïnjecteerd zijn met genetisch gemodificeerd canine adenovirus (gg-CAdV) al dan niet in combinatie met genetisch gemodificeerd adeno-associated virus (gg-AAV). Beide typen virusdeeltjes zijn replicatie-deficiënt en worden in de hersenen van ratten of muizen geïnjecteerd om de signaaloverdracht in de hersenen te kunnen bestuderen.

De aanvrager heeft voor de injectie van de virusdeeltjes in muizen en ratten en daaropvolgende huisvesting een vergunning op DM-II inperkingsniveau. Naar aanleiding van een eerder wijzigingsverzoek is het de aanvrager toegestaan om dieren een week na transductie met gg-AAV te verplaatsen naar D-I inperkingsniveau. De aanvrager verzoekt nu ook de dieren die getransduceerd zijn met gg-CAdV al dan niet in combinatie met gg-AAV een week na toediening naar D-I te mogen overbrengen.

CAdV leidt tot een milde infectie van de luchtwegen van honden. Het wordt niet aangetroffen in andere dieren en lijkt niet te repliceren in ratten- of muizencellen. Voor de productie van gg-CAdV wordt gebruik gemaakt van een productiesysteem waarin de kans op het ontstaan van replicatiecompetent CAdV door homologe recombinatie is geminimaliseerd. Tevens blijkt uit onderzoek van de aanvrager dat gg-CAdV zeer snel uit het bloed van ratten wordt verwijderd en reeds na 1 dag niet meer in het bloed aangetoond kan worden. Het is niet bekend of gg-CAdV op eenzelfde snelle wijze uit het bloed van muizen wordt verwijderd.

Op basis van de beschikbare informatie adviseert de COGEM de werkzaamheden met ratten een week na transductie met gg-CAdV, al dan niet in combinatie met gg-AAV op D-I inperkingsniveau in te schalen. Op dit inperkingsniveau acht zij de risico's voor mens en milieu van beschreven getransduceerde ratten verwaarloosbaar klein. Eenzelfde omlaagschaling van getransduceerde muizen acht de COGEM echter onvoldoende onderbouwd en adviseert zij op DM-II te handhaven.



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 van *in vivo* werkzaamheden met canine adenovirus vectoren

COGEM advies CGM/130902-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een wijzigingsaanvraag van de vergunning IG 00-114 met de titel 'Manipulatie van signaaltransductie in de hersenen' van het Universitair Medisch Centrum Utrecht. Binnen het project worden de effecten van neuropeptiden, transcriptiefactoren en eiwitten die betrokken zijn bij de signaaltransductie in de hersenen bestudeerd. Transgenen, coderend voor bovenstaande peptiden en eiwitten, worden met behulp van genetisch gemodificeerd 'adeno-associated virus' (gg-AAV) in de hersenen van muizen en ratten tot expressie gebracht. De toediening van deze replicatie deficiënte gg-AAV deeltjes vindt plaats op DM-II inperkingsniveau. Een week na toediening is het de aanvrager toegestaan de dieren naar een D-I inperkingsniveau over te plaatsen.

Naast de AAV vectoren maakt de aanvrager bij zijn onderzoek ook gebruik van replicatie deficiënte adenovirusvectoren gebaseerd op *Canine adenovirus* type 2 (CA₂AdV). De *in vivo* werkzaamheden met deze gg-CA₂AdV vectoren zijn vergund op DM-II inperkingsniveau. De aanvrager verzoekt nu ook de ratten en muizen in associatie met gg-CA₂AdV, al dan niet in combinatie met gg-AAV een week na toediening van de vectoren van DM-II naar D-I niveau te mogen verplaatsen. De reden voor dit verzoek is gelegen in het voornemen van de aanvrager om voor de bestudering van het gedrag van de proefdieren optogenetics met *in vivo* electrofysiologie te combineren. De geavanceerde apparatuur die daarvoor nodig is, kan volgens de aanvrager niet volgens de DM-II geldende richtlijnen gedecontamineerd worden. De omlaagschaling van de werkzaamheden naar D-I zou dit onderzoek mogelijk maken.

Canine adenovirus

Canine adenovirus A behoort tot de familie van *Adenoviridae* en het genus *Mastadenovirus*.¹ Het genoom van adenovirus is een lineair dubbelstrengs DNA molecuul en kan worden onderverdeeld in een vroege (Early) en late (Late) regio.² 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 bestaat uit vijf transcriptie-units (E1A, E1B, E2, E3 en E4). De E1A eiwitten zijn betrokken bij de inductie van virale replicatie en expressie van de overige vroege en late genen. De E1B eiwitten beschermen de gastheercel tegen geprogrammeerde celdood (apoptose). De E2 regio codeert voor eiwitten noodzakelijk voor replicatie van het virale genoom. De E3 eiwitten blokkeren de afweerreactie tegen het virus en de E4 eiwitten zijn betrokken bij het controleren van de celcyclus.^{3,4} De late regio codeert voor de capsid-eiwitten waaruit de mantel wordt opgebouwd die het adenovirus genoom omgeeft.

Tot de soort *Canine adenovirus A* behoren twee typen: *Canine adenovirus* type 1 (CA₁AdV) en CA₂AdV type 2 (CA₂AdV). Door kruisreactiviteit is er op basis van serologie geen verschil tussen deze virussen.¹ CA₁AdV en -2 komen algemeen voor in Nederland en er is een effectief vaccin beschikbaar tegen CA₂AdV, dat ook zorgt voor immuniteit tegen CA₁AdV. CA₂AdV is betrokken bij het ontstaan van Kennelhoest of infectieuze tracheobronchitis, een milde ziekte van de bovenste

luchtwegen in honden.^{5,6} De meest voorkomende symptomen zijn een droge hoest gevolgd door kokhalzen, en ophoesten van een witte schuimige afscheiding.

Genetisch gemodificeerd CAAdV

De aanvrager maakt gebruik van replicatie deficiënte CAAdV-2 vectoren. Voor de vervaardiging van deze vectoren wordt de *E1* regio uit het adenovirusgenoom uitgewisseld met hetzij een expressie cassette voor 'green fluorescent protein' (GFP) hetzij voor Cre recombinase. De clonering van deze vectoren vindt plaats in *E. coli* door middel van homologe recombinatie en resulteert in de constructen ptGFP en ptCre.

Door de verwijdering van de *E1* regio is de vector niet meer in staat tot autonome replicatie. Voor de productie van de beoogde CAAdV-2 vectoren wordt daarom gebruik gemaakt van een speciaal voor dit doel ontwikkelde hondecellijn, DK/E1-1, die de adenovirale *E1* eiwitten tot expressie brengt.

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*. *Rep* is belangrijk voor replicatie, en *cap* codeert voor de virusmantel. 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.^{2,7} 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.² Er zijn verschillende serotypen van AAV bekend welke onder andere verschil vertonen in gastheerspecificiteit en weefsel tropisme.^{1,8} 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 een ziektebeeld.⁹ Overdracht van het virus vindt waarschijnlijk plaats via de respiratoire of gastro-intestinale route.²

Genetisch gemodificeerd AAV

De aanvrager maakt gebruik van replicatie deficiënte AAV2/1 en AAV2/5 partikels. Deze deeltjes bevatten de ITRs van AAV2 maar worden tijdens de productie gepseudotyperd voor respectievelijk AAV1 en AAV5. Deze viruspartikels worden gegenereerd door het plasmide pAAV en een packaging/ helperplasmide te co-transfecteren in HEK 293T cellen. Het plasmide pAAV bevat de ITR's van AAV2, de te expresseren genen en een GFP sequentie onder controle van een CMV promotor. Het helperplasmide bevat de voor de productie benodigde *rep* en *cap* genen, alsmede adenovirus type 5 helper functies VA, E2A en E4.

Eerder advies

De COGEM heeft twee keer eerder geadviseerd over de onderhavige vergunning.^{10,11} In haar eerste advies heeft zij de risico's besproken van het voorgenomen gebruik van AAV-partikels in ratten en muizen. Deze AAV vectoren bevatten alleen de ITRs en transgenen van interesse. Voor de productie werden de ontbrekende *rep* en *cap* genen alsmede de overige benodigde functies door een helperplasmide gecodeerd. De productiecellen werden op aanwezigheid van helpervirussen getest en er werd tijdens de productie door de werknemers een neus- en mondkapje gedragen. Door deze aspecten achtte de COGEM de kans op vorming van replicatiecompetent AAV verwaarloosbaar klein. Zij adviseerde daarom de injectie van het gg-AAV in muizen en ratten plaats te laten vinden op DM-II inperkingsniveau. Zij was daarbij van mening dat de dieren een week na toediening van DM-II naar D-I inperkingsniveau overgeplaatst konden worden als aan twee aanvullende voorschriften werd voldaan. Ten eerste diende voorkomen te worden dat contaminatie plaats kon vinden met wildtype adenovirussen. En daarnaast diende voor terugplaatsing de afwezigheid van AAV deeltjes in het bloed van de dieren met een PCR aangetoond te worden.

Op basis van aanvullende gegevens van de aanvrager zelf en uit de wetenschappelijke literatuur heeft de COGEM in het tweede advies geconcludeerd dat de voorwaarde om het bloed voorafgaand aan de omlaagschaling met PCR te testen op de afwezigheid van AAV achterwege gelaten kon worden.¹¹

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over de inschaling van de werkzaamheden met gg-CAdV.

Adviesvraag

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van ratten en muizen naar D-I inperkingsniveau een week nadat gg-CAdV al dan niet in combinatie met gg-AAV aan deze dieren is toegediend.

Overweging

Om tot een correcte inschaling van de voorgenomen in vivo werkzaamheden te kunnen komen, heeft de COGEM een aantal aspecten bij haar risicobeoordeling betrokken. Het betreft de kans op het ontstaan van replicatiecompetent adenovirus, de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes 1 week na de toediening en de mogelijke interactie tussen gg-CAdV en gg-AAV. De overwegingen van de COGEM bij deze aspecten treft u aan in onderstaande paragrafen.

Ontstaan van replicatiecompetent adenovirus

De CAdV-2 vectoren die de aanvrager voor zijn onderzoek gebruikt, zijn replicatie deficiënt door het ontbreken van het E1 gebied. Voor de productie van deze CAdV-2 vectoren wordt gebruik gemaakt van een speciale hondencellijn waarin E1 tot expressie wordt gebracht. Volgens Kremer *et al.* die het productiesysteem heeft ontwikkeld, is bij het ontwerp van de vectoren en de helpercellijn elke homologe recombinatie mogelijkheid geëlimineerd.¹² De twee CAdV vector batches die deze

onderzoeksgroep met deze cellijn heeft geproduceerd, zijn negatief getest op de aanwezigheid van replicatiecompetent (rc-) CAdV.¹² De aanvrager leidt hieruit af dat gedurende de productie van gg-CAdV geen rc-CAdV zal worden gevormd. Tevens wordt door de aanvrager geclaimd dat wildtype CAdV-2 niet repliceert in muizen- en rattencellen. Op basis van deze twee argumenten wordt de vectorbatch niet standaard gecontroleerd op de afwezigheid van rc-CAdV.

Door het elimineren van homologe sequenties tussen de helpercellijn en de CAdV vectoren is de COGEM van mening dat de kans op het ontstaan van replicatiecompetent adenovirus door homologe recombinatie is geminimaliseerd. Hierdoor rest alleen de mogelijkheid dat replicatiecompetent adenovirus ontstaat door niet-homologe recombinatie. De kans dat een dergelijke recombinatie gebeurtenis ertoe leidt dat het E1 gebied correct tot expressie komt, acht de COGEM zeer klein.

Zij merkt daarbij op dat CAdV van nature wordt aangetroffen in honden en in de wetenschappelijke literatuur geen aanwijzingen zijn gevonden dat het CAdV in andere dieren voorkomt.¹³ Tezamen met de claim dat CAdV niet repliceert in muizen en rattencellen acht de COGEM de kans zeer klein dat eventueel ontstaan rc-CAdV in muizen of ratten zal repliceren.

De COGEM voegt hieraan toe dat de aanvrager in een eerdere wijzigingsaanvraag aangegeven heeft gebruik te maken van ratten en muizen die vrij zijn van wildtype AAV en zogenaamde AAV helpervirussen zoals adenovirus. In combinatie met de natuurlijke infectieroute van adenovirus via de luchtwegen acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat wildtype adenovirus in de hersenen van deze dieren aanwezig is en door complementatie van het ontbrekende E1 gebied de replicatie van gg-CAdV zal faciliteren.

Concluderend is de COGEM van mening dat de kans dat rc-CAdV tijdens voorgenomen werkzaamheden ontstaat en in genoemde proefdieren kan repliceren verwaarloosbaar klein.

Aanwezigheid van vrije gg-CAdV deeltjes

De aanvrager zal maximaal 1×10^9 gg-CAdV deeltjes in de hersenen van muizen of ratten inspuiten. Ter onderbouwing van zijn verzoek om omlaagschaling heeft de aanvrager een uur na toediening van CAdV in de hersenen van ratten het bloed geanalyseerd op de aanwezigheid van virus. Met de kwantitatieve PCR die de aanvrager hiervoor heeft gebruikt, werd geen virus aangetoond. Tevens heeft de aanvrager de halfwaardetijd van de CAdV vectoren in bloed onderzocht. Op basis van de analyse van bloedmonsters van verschillende momenten na toediening van de gg-CAdV vector in de staartvene van ratten, heeft de aanvrager de halfwaardetijd van gg-CAdV vastgesteld op ca. 62 min. Na 24 uur was het virus niet meer detecteerbaar in het bloed.

De COGEM wijst erop dat virus dat in de hersenen wordt ingespoten door de bloed-hersenbarrière wordt afgeschermd van de bloedsomloop en niet naar de overige delen van het lichaam zal verspreiden. Hierdoor wordt de kans op uitscheiding van gg-CAdV gereduceerd. Tevens blijkt de halfwaardetijd in de bloedsomloop van ratten dusdanig kort dat een dag na intraveneuze toediening van de maximale dosis theoretisch slechts 100 partikels overblijven. De COGEM acht de kans derhalve verwaarloosbaar klein dat in voorgenomen onderzoek een week na toediening nog vrije gg-CAdV deeltjes in het bloed van ratten worden aangetroffen.

De aanvrager heeft de persistentie van gg-CAdV in muizen niet onderzocht. Ook de wetenschappelijke literatuur biedt geen inzicht in de persistentie van CAdV in de circulatie van muizen. De COGEM merkt op dat onderzoek aan de farmacokinetiek van humaan adenovirus type 5 (HAdV-5) in het bloed van onder andere muis en rat substantiële verschillen aan het licht heeft gebracht.¹⁴ Terwijl HAdV-5 vrijwel volledig wordt weggevangen door binding aan erythrocyten in rattenbloed, is dit slechts in beperkte mate het geval in muizenbloed. Dit bemoeilijkt de interpretatie van de beschikbare informatie over de verwijdering van adenovirus uit bloedsomloop. Hierdoor kan de COGEM niet uitsluiten dat CAdV zich in de bloedsomloop van muizen anders gedraagt dan in de bloedsomloop van ratten, en kan zij de mate van verwijdering van CAdV uit de bloedsomloop van muizen niet met voldoende zekerheid voorspellen aan de hand van de aangeleverde gegevens in ratten. Hoewel zij van mening is dat de locale injectie van gg-CAdV in de hersenen de hoeveelheid van vrije vector deeltjes in het bloed zal reduceren, kan zij daarom niet uitsluiten dat een week na toediening nog gg-CAdV deeltjes in de bloedsomloop van de muizen aanwezig zijn.

Interactie van gg-CAdV en gg-AAV

Voor *in vivo* replicatie van de gg-AAV deeltjes moeten de ontbrekende *rep* en *cap* genen van AAV gecomplementeerd worden en zijn helperfuncties als VA, E2A en E4 van adenovirus vereist. Eerder is door de aanvrager aangegeven dat de muizen en ratten die in deze experimenten worden gebruikt vrij zijn van wildtype AAV en helpervirussen. Hoewel wildtype adenovirus hierdoor niet in betreffende dieren aanwezig zal zijn, merkt de COGEM op dat de coderende sequenties voor VA, E2A en E4 in het genoom van gg-CAdV aanwezig zijn. Voor efficiënte expressie van deze genen is replicatie van adenovirus nodig. Op basis van bovenstaande overweging acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat het gg-CAdV in muizen en ratten zal kunnen repliceren. Tevens is zij van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat wildtype AAV in de betreffende dieren aanwezig is. De COGEM acht daarom de kans verwaarloosbaar klein dat injectie van zowel gg-CAdV als gg-AAV in de hersenen van muizen of ratten zal leiden tot replicatie van gg-AAV.

Advies

Classificatie van Canine adenovirus type 2

Vanwege de aard van de ziekte, het feit dat CAdV-2 enzoötisch is in Nederland en er een effectief vaccin beschikbaar is, adviseert de COGEM CAdV-2 in te delen in pathogeniteitsklasse 2. Conform deze classificatie is de COGEM van mening dat de toediening van de replicatie deficiënte gg-CAdV aan muizen en ratten ingeschaald dient te worden op DM-II inperkingsniveau.

Inschaling van in vivo werkzaamheden 1 week na toediening van vectoren

Op basis van bovenstaande overweging acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat bij voorgenomen werkzaamheden rc-CAdV's ontstaan die in de beoogde dieren zal repliceren, en een week na toediening nog vrije gg-CAdV deeltjes in het bloed van ratten aanwezig zullen zijn. Tevens acht zij de kans verwaarloosbaar klein dat de aanwezigheid van gg-CAdV in dezelfde cel als gg-AAV door complementatie van in de AAV-vector ontbrekende functies zal leiden tot

replicatie van betreffende gg-AAV vector. Zij adviseert daarom ratten een week na transductie met gg-CAdV al dan niet in combinatie met gg-AAV naar D-I omlaag te schalen. Op dit inperkingsniveau acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van de getransduceerde ratten verwaarloosbaar klein.

Doordat er geen gegevens beschikbaar zijn over de halfwaarde tijd van gg-CAdV in de muis en er substantiële verschillen zijn waargenomen voor humane adenovirussen in de bloedsomloop van ratten en muizen kan de COGEM niet uitsluiten dat er een week na toediening in de muis nog vrije virusdeeltjes aanwezig zijn. Totdat onderzoek hierover uitsluitsel biedt, adviseert de COGEM daarom de inschaling voor muizen die geïnjecteerd zijn met gg-CAdV al dan niet in combinatie met gg-AAV te handhaven op DM-II inperkingsniveau.

Referenties

1. 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
2. Knipe DM & Howley PM (2001). Fields virology, volume two, fourth edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
3. McConnell MJ & Imperiale, MJ (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 15:1022-1033
4. Miller DL *et al.* (2006). Adenovirus type 5 exerts genome-wide control over cellular programs governing proliferation, quiescence, and survival. *Genome Biology* 8:R58
5. Buonavoglia C & Martella V (2007). Canine respiratory viruses. *Vet. Res.* 38 (2), 355–373
6. Green CE (2006). Infectious Diseases of the Dog and Cat, third ed. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 54–61
7. Smith-Arica JR en Bartlett JS (2001). Gene therapy: recombinant adeno-associated virus vectors. *Current cardiology reports* 3: 43-49
8. Zincarelli C *et al.* (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Therapy* 16:1073-1080
9. Gonçalves MA (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology journal* 2: 43
10. COGEM (2002). Advies: 'Manipulatie van signaaltransductie in de hersenen'. CGM/020319-01
11. COGEM (2009). *In vivo* experimenten met een vector gebaseerd op adeno-associated virus. COGEM advies CGM/091130-05
12. Kremer EJ *et al.* (2000). Canine adenovirus vectors: an alternative for adenovirus mediated gene transfer. *J Vir.* 74:505-12
13. Bru T *et al.* (2010). An update on Canine adenovirus type 2 and its vectors. *Viruses* 2:2134-53
14. Cichon G *et al.* (2003). Titer determination of Ad5 in blood: a cautionary note. *Gene Ther.* 10: 1012-17