

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 24 februari 2014
KENMERK CGM/140224-01
ONDERWERP Advies: Inschaling gg-lentivirus en gg-AAV coderend voor botuline of tetanus toxine

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een wijzigingsverzoek van de vergunning IG 02-185 met de titel "De manipulatie van de expressie van eiwitten betrokken bij de afgifte van neurotransmitters in de hersenen van rat en muis" van de Vereniging voor christelijk hoger onderwijs, wetenschappelijk onderzoek en patiëntenzorg van de Vrije Universiteit te Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) lentivirussen en gg-adeno-associated virussen (gg-AAVs) die de coderende sequentie bevatten voor de lichte eiwitketen van het botuline neurotoxine type A, C of E of van het tetanus neurotoxine. De aanvrager wil met deze gg-virussen de signaaloverdracht tussen hersencellen van zoogdieren onderzoeken. De botuline en tetanus neurotoxinen bestaan normaliter uit een zware en een lichte keten. De combinatie van deze twee ketens maakt deze neurotoxinen zeer toxisch, doordat de overdracht van zenuwpulsen tussen dierlijke cellen wordt geblokkeerd. De lichte keten alleen kan de cellen niet binnendringen en dit toxische effect sorteren. Door de infectie van cellen met gg-lentivirus of gg-AAV wordt de lichte keten intracellulair tot expressie gebracht. Dit zal leiden tot een toxisch effect in de geïnfecteerde cellen. Het is daarom van belang dat de gg-virussen zich niet in het milieu kunnen verspreiden. Beide gg-virussen zijn volgens de COGEM zo aangepast dat ze zich niet zelfstandig kunnen repliceren. Bovendien acht zij de kans verwaarloosbaar klein dat er tijdens de experimenten een virus kan ontstaan dat de lichte keten van het botuline bevat en in staat is te repliceren. De COGEM is daarom van mening dat laboratoriumhandelingen met zowel de gg-lentivirussen als de gg-AAVs kunnen plaatsvinden op ML-II inperkingsniveau. Om eventuele risico's, zoals infectie van de medewerker met beschreven gg-virussen verder te minimaliseren, dienen aanvullende voorschriften, zoals beschreven in het advies, in acht genomen te worden.

Lentivirale vector en AAV vector coderend voor de lichte keten van botuline of tetanus toxine

COGEM advies CGM/140224-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met recombinante lentivirus en recombinante AAV vectoren. De aanvrager geeft aan dat deze vectoren replicatiedeficiënt zijn en een transgen bevatten dat codeert voor de lichte keten van het Botuline Neurotoxine –A, -C of -E (BoNT) of voor de lichte keten van het Tetanus Neurotoxine (TeNT). De aanvrager is van plan deze gg-virussen te produceren en vervolgens *in vitro* te gebruiken om de signaaloverdracht in hersencellen van zoogdieren te bestuderen. De aanvrager heeft gevraagd de handelingen met beide vectoren op ML-II inperkingsniveau te mogen uitvoeren.

Lentivirale vectoren

Lentivirale vectoren zijn afgeleid van lentivirussen en behoren tot de familie van retrovirussen (*Retroviridae*, genus *Lentivirus*).¹ Een lentivirus deeltje bevat twee enkelstrengs RNA kopieën van het virale genoom van ieder circa 9.3 kb. Als basis voor de in deze aanvraag beschreven lentivirale vectoren wordt gebruik gemaakt van het genoom van het *Human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1). Het genoom van HIV-1 heeft aan weerszijden een zogenaamde *Long Terminal Repeat* (LTR). Daarnaast bevat het genoom een ‘packaging’ signaal, drie structurele genen (*gag*, *pol* en *env*), vier accessoire genen (*vif*, *vpr*, *vpu* en *nef*) en twee regulatoire genen (*tat* en *rev*).²

Voor de productie van de lentivirale vectoren worden de verschillende virusfuncties opgesplitst en verdeeld over verschillende plasmiden. Deze plasmiden moeten gezamenlijk in een gastheercel getransfecteerd worden om virusdeeltjes te kunnen produceren.^{2,3} Door deze opsplitsing wordt de kans op het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus (RCL) tijdens de productie van de lentivirale vector gereduceerd en neemt de bioveiligheid van deze vectoren toe. Met het oog op deze bioveiligheid zijn in de loop van de tijd verschillende generaties van productiesystemen ontwikkeld.

Naast de verbeteringen aan het productiesysteem, is de bioveiligheid van het lentivirale vectorsysteem ook verbeterd door de ontwikkeling van zelf-inactiverende vectoren.^{4,5} Uit deze zogenaamde SIN vectoren is een deel van de 3’LTR verwijderd. Dit reduceert de kans op mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheer aanzienlijk, in het geval dat een superinfectie optreedt van de getransduceerde cel met een wildtype lentivirus.

Van nature infecteert HIV-1 de verschillende cellen van het immuunsysteem zoals T-lymfocyten, macrofagen en monocytten. Voor een bredere toepasbaarheid van lentivirale vectoren wordt het gastheerbereik meestal uitgebreid door pseudotypering van de lentivirale deeltjes met het VSV-G.

Adeno-associated virus

AAV behoort tot de familie *Parvoviridae* en het genus *Dependovirus*.⁶ 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.^{7,8,9} 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.⁷ Er zijn verschillende serotypen van AAV bekend die verschillen in gastheerspecificiteit en weefsel-tropisme.^{8,10} 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.¹¹ Overdracht van het virus vindt waarschijnlijk plaats via de respiratoire of gastro-intestinale route.⁷

Botuline en Tetanus Neurotoxines

Botuline en tetanus neurotoxines (BoNT's en TeNT) zijn zeer toxisch en worden geproduceerd door respectievelijk de bacterie *Clostridium botulinum* en *Clostridium tetani*.¹² Van de BoNT's zijn zeven verschillende serotypen bekend van het TeNT één. Deze neurotoxines zijn polypeptides die bestaan uit een lichte (L-chain) en een zware (H-chain) eiwitketen. De zware keten bindt extracellulair aan de neuronale receptoren van dierlijke cellen en zorgt voor de verplaatsing van het toxine door het plasmamembraan naar het cytosol. De lichte keten bezit een proteasefunctie en knipt, afhankelijk van het type neurotoxine, één van de eiwitten synaptobrevin, syntaxin 1A of SNAP-25 (synaptosomal-associated protein).¹³ Door de splitsing van deze eiwitten wordt de binding tussen het zogenaamde synaptische vesicle en het presynaptische membraan geblokkeerd en de signaaloverdracht tussen zenuwcellen voorkomen. Hierdoor zullen spieren verslappen en dit kan de dood tot gevolg hebben.¹⁴

Voorgenomen werkzaamheden

Productie en gebruik van recombinante lentivirus deeltjes

Voor het beschreven onderzoek zal de aanvrager gebruik maken van lentivirale vectoren die coderen voor de lichte keten van BoNT-A, -C, -E of TeNT en gepseudotypeerd zijn met het VSV-G. Deze lentivirale partikels worden geproduceerd met behulp van een productiesysteem dat gebaseerd is op co-transfectie van drie verschillen plasmiden in HEK293 cellen. De voor de virusproductie benodigde lentivirale eiwitten zijn verdeeld over twee plasmiden. Als pseudotyping vector zal de aanvrager gebruik maken van het plasmide pMD.G2. De benodigde Gag, Pol en regulatoire eiwitten worden gecodeerd door pCMVΔR8.74. Het derde plasmide is de zogenaamde transfervector, waarin de gewenste lichte keten van een neurotoxine wordt gekloneerd omgeven

door de virale LTR's. Als basis voor de transfervector wil de aanvrager gebruik maken van p156RRLsinPPThCMVMCSpre, pLentilox 3.7, pFUW en pFUWTetO.

Na de productie worden de recombinante lentivirus deeltjes gebruikt voor transductie van zogenaamde chromaffine en neuronale cellen van muizen. De getransduceerde cellen worden geanalyseerd met behulp van microscopie, electrofysiologie en antilichaamkleuringen.

Productie en gebruik van recombinante AAV-deeltjes

Voor het beschreven onderzoek zal de aanvrager ook gebruik maken van replicatie-deficiënte AAV-deeltjes die coderen voor de lichte keten van BoNT-A, -C, -E of TeNT en de manteleiwitten van hetzij AAV serotype 1, 2, 3, 4, 5, 6 of 8 bevatten. Deze viruspartikels worden geproduceerd met behulp van een productiesysteem dat gebaseerd is op de co-transfectie van verschillende plasmiden in HEK 293 cellen.

Voor de productie van gg-AAV deeltjes met een mantel van AAV serotype 1, 2, 3, 4, 5, of 6 is co-transfectie met respectievelijk het helperplasmide pDP1, -2, -3, -4, -5 of -6 nodig en een plasmide dat het genoom van het beoogde gg-AAV bevat. Het gg-AAV genoom is gekloneerd in plasmide pTR-CGW of pTR-UF2 en bevat de ITR's, een coderende sequentie voor het 'green fluorescent protein' (GFP) onder controle van een CMV promotor, en de te expresseren genen voor de lichte ketens van de beschreven neurotoxinen. Het helperplasmide (pDP1 - pDP6) bevat de voor de productie benodigde *rep* en *cap* genen en de adenovirus type 5 helperfuncties VA, E2A en E4.

Voor de productie van gg-AAV deeltjes met een mantel van AAV serotype 8 zijn de benodigde genen verdeeld over drie plasmiden. Naast het plasmide met het gg-AAV genoom wordt gebruik gemaakt van de twee helperplasmiden p5E18-VD2/8 en pAdDeltaF6. Het helperplasmide p5E18-VD2/8 bevat de voor de productie benodigde *rep* en *cap* genen en de adenovirus type 5 helperfuncties (VA, E2A en E4) worden door pAdDeltaF6 aangeleverd.

Na de productie worden de gg-AAV deeltjes gebruikt voor transductie van zogenaamde chromaffine en neuronale cellen van muizen. De getransduceerde cellen worden geanalyseerd met behulp van microscopie, elektrofysiologie en antilichaamkleuringen.

Eerder COGEM advies

gg-SFV vector coderend voor lichte keten van BoNT

In 2007 heeft de COGEM geadviseerd over de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met een replicatiedeficiënt, recombinant *Semliki forest virus* vector met een transgen dat codeert voor de lichte keten van een BoNT.¹⁵ In haar advies achtte de COGEM het waarschijnlijk dat de lichte keten in de geïnfecteerde cel zijn volledige cytotoxische activiteit zal hebben, en was zij van mening dat de mogelijke risico's voor mens en milieu volledig afhangen van de biologische inperking van het te gebruiken SFV vectorsysteem. De COGEM achtte de kans dat een replicatiecompetent rSFV zal ontstaan dat tevens codeert voor de lichte keten van BoNT verwaarloosbaar klein. Gezien de beperkte stabiliteit van SFV en de transmissie via muggen was zij tevens van mening dat een ML-III inperkingsniveau ten opzichte van een ML-II inperkingsniveau geen extra veiligheid biedt voor de medewerker. Derhalve heeft zij geadviseerd de laboratoriumhandelingen met het gg-SFV op ML-II niveau uit voeren.

Om de risico's verder te minimaliseren heeft de COGEM voor de productie van de gg-SFV partikels de volgende aanvullende voorschriften geadviseerd te hanteren:

- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse II;
- De aanwezigheid van de SHQL mutatie in het SFV p62 precursoreiwit dient geverifieerd te worden in elke batch plasmide die wordt opgegroeid en wordt gebruikt voor de productie van recombinant SFV;
- Het dragen van handschoenen is verplicht;
- Ter voorkoming van besmetting door prik- of snij-incidenten dient de aanvrager maatregelen te treffen, bijvoorbeeld het gebruik van kevlar handschoenen.

Voor de activering van de rSFV partikels met chymotrypsine, de infectie van animale cellen met deze partikels en handelingen met de geïnfecteerde cellen heeft de COGEM de volgende aanvullende voorschriften geadviseerd:

- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse II;
- Het dragen van handschoenen is verplicht;
- Ter voorkoming van besmetting door prik- of snij-incidenten dient de aanvrager maatregelen te treffen, bijvoorbeeld het gebruik van kevlar handschoenen;
- De analyse van geïnfecteerde cellen vindt plaats onder ML-II inperkingsniveau in een gesloten systeem, tenzij de cellen voor de analyse plaatsvindt, worden gefixeerd.

Lentivirale vectoren

Voor de inschaling van werkzaamheden met lentivirale vectoren heeft de COGEM in 2009 een generiek advies gepubliceerd. Hierin is de inschaling mede afhankelijk van het te gebruiken packagingsysteem en het feit of er al dan niet gebruik wordt gemaakt van een SIN vector.¹⁶ Voor een tweede generatie lentiviraal packagingsysteem met SIN vector heeft zij geadviseerd de productie in te schalen op ML-II niveau, en daarbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Het gastheermateriaal dient vrij te zijn van HIV-1, HIV-2, *Human T-cell lymphotropic virus* type 1 (HTLV-1), HTLV-2, *Simian immunodeficiency virus* (SIV) en andere relevante lentivirussen met tropisme voor de gastheercel,
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II uitgevoerd te worden,
- tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen

Onder navolging van bovengenoemde voorschriften bij de productie heeft de COGEM geadviseerd de transductie van cellen met SIN vectoren, die geproduceerd zijn met het packagingsysteem van de tweede generatie op ML-II niveau in te schalen en daarbij de volgende aanvullende voorschriften toe te passen:

- tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen,
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd.

Zij achtte het hierbij niet nodig dat de batch van het gg-lentivirus op RCL wordt getest.

AAV vectoren

In 2002 en 2012 heeft de COGEM geadviseerd over de inschaling van *in vivo* laboratorium werkzaamheden met AAV deeltjes die geproduceerd werden met een productiesysteem dat gebaseerd was op co-transfectie van twee plasmiden.^{17,18} Dit systeem berust op een helperplasmide dat codeert voor de *rep* en *cap* genen alsmede de overige functies benodigd voor het maken van het gg-AAV en een plasmide met de genetische informatie van het gg-AAV deeltje. Dit bevatte alleen dat de ITRs en de beoogde transgenen. Gezien de aard van het productiesysteem achtte de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat bij productie van gg-AAV met dit systeem recombinatie tussen de plasmiden op zou treden. Aanvullende maatregelen zoals het testen van de productiecellen op aanwezigheid van helpervirussen en het dragen van een neus- en mondkapje door de werknemers, verkleinen daarbij het risico dat tijdens de productie van de virussen contaminatie optreedt met wildtype adeno- of herpesvirus. De COGEM achtte de kans daarom verwaarloosbaar klein dat met het genoemde productiesysteem replicatiecompetent AAV zou ontstaan.

Overweging en advies

De lichte keten van BoNT en TeNT

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over de inschaling van werkzaamheden met een lentivirale vector en een AAV vector die coderen voor de lichte keten van BoNT-A, -C, -E of TeNT. In tegenstelling tot het gehele toxine, dat zeer toxisch is, blijkt uit de wetenschappelijke literatuur dat de lichte keten van deze neurotoxines extracellulair geen toxiciteit laat zien.¹⁹ Hoewel de enzymatische functionaliteit van deze neurotoxines, het zogenaamde metalloprotease zich op de lichte keten bevindt, is de aanwezigheid van de zware keten noodzakelijk om de lichte keten over het celmembraan de cel in te loodsen.^{12,20}

Op basis van bovenstaande is de COGEM van mening dat het gebruik van alleen de lichte keten van BoNT of TeNT niet gelijkgesteld zou moeten worden met het gebruik van het complete neurotoxine. Zij merkt daarbij op dat door gebruik te maken van een virale vector de lichte keten van deze neurotoxines intracellulair tot expressie zal worden gebracht. De COGEM acht het hierdoor waarschijnlijk dat de lichte keten in de geïnfecteerde cel zijn volledige cytotoxische activiteit zal hebben. Door de afwezigheid van de zware keten zal dit effect echter beperkt blijven tot de geïnfecteerde cel en zich na lysis van deze cel niet zelfstandig verspreiden. De COGEM is daarom van mening dat de mogelijke risico's voor mens en milieu afhangen van de biologische inperking van het te gebruiken vectorsysteem en de mogelijkheid dat een medewerker geïnfecteerd kan worden met deze vectoren.

Productie van en werkzaamheden met een lentivirale vector die codeert voor de lichte keten van BoNT of TeNT

Voor de productie van de lentivirale vectoren maakt de aanvrager gebruik van een productiesysteem waarin de benodigde virale functies verdeeld zijn over drie plasmiden. Daarbij bevat het packagingconstruct naast *gag* en *pol* ook de regulatoire genen *tat* en *rev*. De COGEM is

van mening dat dit een zogenaamd tweede generatie packagingsysteem betreft. Tevens merkt zij op dat de verschillende transfervectoren die de aanvrager van plan is te gebruiken de promotor regio uit het U3 domein van de LTR missen. Dit is kenmerkend voor een zelf-inactiverende SIN vector.

Conform haar eerdere generieke advies is de COGEM van mening dat tijdens de productie van lentivirale SIN vectoren met het packagingsysteem van de tweede generatie twee recombinaties moeten optreden, de accessoire genen moeten worden opgenomen in het genoom van de vector en de LTR van het SIN-construct gerepareerd dient te worden, alvorens er een replicatiecompetent lentivirus (RCL) ontstaat. In de wetenschappelijke literatuur is dit nog nooit gerapporteerd voor een tweede generatie packagingsysteem in combinatie met een SIN vector.

Op basis hiervan acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er met dit productiesysteem RCL wordt gevormd. De COGEM merkt hierbij op dat voor het ontstaan van een replicatiecompetent lentivirus met de coderende sequentie voor de lichte keten van BoNT of TeNT nog een extra recombinatie nodig is.

Aangezien de COGEM de kans op een replicatiecompetente lentivirale vector verwaarloosbaar klein acht, is zij van mening dat de mogelijke risico's voor mens en milieu beperkt zijn tot het risico van een eventuele infectie van een medewerker met de beschreven lentivirale vector. Door de combinatie van de virale vector met de coderende sequentie voor de lichte keten van BoNT of TeNT wordt de lichte keten intracellulair tot expressie gebracht. De COGEM is van mening dat het cytotoxische effect dat de licht keten teweegbrengt zich zal beperken tot de geïnficeerde cellen. De COGEM merkt op dat het inperkingsniveau ML-III in dit kader niets toevoegt aan inperkingsniveau ML-II om de risico's van besmetting van de laboratoriummedewerker te beperken. Wel adviseert de COGEM ter preventie van een mogelijke infectie van de medewerker aanvullende werkvoorschriften te hanteren waarmee snij- en prikincidenten worden voorkomen en de veiligheid van de medewerkers kan worden gewaarborgd.

Gezien bovenstaande overwegingen, adviseert de COGEM productie van de lentivirale vectoren die de coderende sequentie bevatten voor de licht keten van BoNT A, C, E of TeNT op ML-II inperkingsniveau in te schalen. Voor het waarborgen van de veiligheid van mens en milieu acht zij daarbij de volgende aanvullende voorschriften van belang:

- Het gastheermateriaal dient vrij te zijn van HIV-1, HIV-2, *Human T-cell lymphotropic virus* type 1 (HTLV-1), HTLV-2, *Simian immunodeficiency virus* (SIV) en andere relevante lentivirussen met tropisme voor de gastheer cel,
- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse II;
- Het dragen van handschoenen is verplicht;
- Voor werkzaamheden met 'sharps' worden maatregelen getroffen om besmetting door prik- of snij-incidenten te voorkomen.

In de aanvraag wordt geen informatie aangeleverd of en op welke wijze de cellen worden gefixeerd voor analyse plaatsvindt. Tevens zijn er geen gegevens overlegd over de te verwachten reductieratio van de lentivirale vector op het moment van analyse. De COGEM adviseert daarom de infectie van animale cellen met de bovengenoemde lentivirale deeltjes en analyse van de

geïnficeerde cellen op ML-II inperkingsniveau in te schalen. Tevens adviseert zij daarbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse II;
- Het dragen van handschoenen is verplicht;
- Voor werkzaamheden met 'sharps' worden maatregelen getroffen om besmetting door prik- of snij-incidenten te voorkomen.

Productie van en werkzaamheden met de AAV vector die codeert voor de lichte keten van BoNT of TeNT

Wildtype AAV kan niet autonoom repliceren in een gastheercel, daarvoor is de aanwezigheid van een helpervirus, zoals adenovirus of herpesvirus nodig. De COGEM is derhalve van mening dat AAV bij afwezigheid van een helpervirus van nature al biologisch ingeperkt is. Om deze afhankelijkheid te duiden, wordt een AAV sequentie waarvan de replicatie status vergelijkbaar is met het wildtype AAV hieronder als 'replicatie-competent' aangemerkt.

Logischerwijs zijn bij de productie van AAV vectoren naast de benodigde AAV eiwitten ook de helpervirus functies noodzakelijk. De aanvrager geeft aan gebruik te willen maken van een productiesysteem waarin de benodigde AAV-eiwitten en adenoviruseiwitten op hetzelfde helperplasmide of op twee verschillende helperplasmiden worden gecodeerd. Doordat in deze helperplasmiden verschillende adenovirusgenen ontbreken, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er tijdens de productie adenovirusdeeltjes worden gevormd.

Voor het ontstaan van 'replicatie-competent' AAV is er in het beschreven productiesysteem een recombinatie nodig tussen de *rep* en *cap* genen op het helperplasmide en de ITR's op het plasmide dat het genoom van de beoogde AAV vector bevat. Door de afwezigheid van sequentieoverlap is de COGEM van mening dat dit een niet-homologe recombinatie vereist. Zij acht de kans dat dit plaatsvindt en leidt tot een 'replicatie-competent' AAV zeer klein. Onder navolging van aanvullende maatregelen zoals het testen van de productiecellen op de aanwezigheid van helpervirussen en het voorkomen van insleep van helpervirussen tijdens de werkzaamheden wordt de kans op contaminatie met wildtype adeno- of herpesvirus en de daaruit voortvloeiende replicatie van 'replicatie-competent' AAV geminimaliseerd.

De COGEM merkt hierbij op dat een recombinatie waarbij een 'replicatie-competent' AAV genoom ontstaat dat tevens de sequentie voor de lichte keten van een neurotoxine bevat de beperkte packagingcapaciteit van AAV overstijgt.²¹ Hierdoor acht zij de kans verwaarloosbaar klein dat een dergelijk genoom efficiënt wordt ingepakt in een virusdeeltje.

Aangezien de COGEM de kans verwaarloosbaar klein acht dat een 'replicatie-competent' AAV ontstaat die codeert voor de lichte keten van een neurotoxine, is zij van mening dat de mogelijke risico's voor mens en milieu beperkt zijn tot het risico van een eventuele infectie van een medewerker met de replicatie deficiënte AAV vector. Net zoals beschreven voor de lentivirale vector is de COGEM van mening dat het cytotoxische effect ten gevolge van een infectie van de medewerker met de AAV vector zich zal beperken tot de geïnficeerde cellen. Ook voor de werkzaamheden met de AAV vector die de coderende sequentie voor de lichte keten van BoNT of

TeNT bevat, adviseert zij aanvullende werkvoorschriften te hanteren waarmee snij- en prikincidenten worden voorkomen en de veiligheid van de medewerkers kan worden gewaarborgd.

Gezien bovenstaande overwegingen, adviseert de COGEM productie van de AAV vectoren die de coderende sequentie bevatten voor de licht keten van BoNT A, C, E of TeNT op ML-II inperkingsniveau in te schalen. Voor het waarborgen van de veiligheid van mens en milieu acht zij daarbij de volgende aanvullende voorschriften van belang:

- Het gastheermateriaal dient vrij te zijn van wildtype AAV, wildtype adenovirus en andere helpervirussen;
- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse II;
- Het dragen van handschoenen is verplicht;
- Voor werkzaamheden met 'sharps' worden maatregelen getroffen om besmetting door prik- of snij-incidenten te voorkomen.

In de aanvraag wordt geen informatie aangeleverd of en op welke wijze de cellen worden gefixeerd voordat analyse plaatsvindt. De COGEM adviseert daarom de infectie van animale cellen met de bovengenoemde AAV deeltjes en analyse van de geïnfecteerde cellen op ML-II inperkingsniveau in te schalen. Tevens adviseert zij daarbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse II;
- Het dragen van handschoenen is verplicht;
- Voor werkzaamheden met 'sharps' worden maatregelen getroffen om besmetting door prik- of snij-incidenten te voorkomen.

Conclusie

Concluderend is de COGEM van mening dat indien de voorgenomen werkzaamheden met zowel gg-lentivirus als gg-AAV op ML-II inperkingsniveau plaatsvinden en daarbij de genoemde aanvullende voorschriften worden gehanteerd, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. King AMQ *et al.* (eds) (2012). Virus taxonomy. Chap. Family Retroviridae. 477-495
2. Knipe DM and Howley PM (eds) (2001). Fields Virology. Chap. 59: HIV's and their replication. 1971-2041
3. Cockrell AS and Kafri T (2007). Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol. Biotechnol.* 36:184-204
4. Zufferey R *et al.* (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.* 72:9873-9880
5. Miyoshi H *et al.* (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J. Virol.* 72:8150-8157
6. King AMQ *et al.* (eds) (2012). Virus taxonomy. Chap. Family Parvoviridae. 405-425

7. 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
8. 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
9. Smith-Arica JR en Bartlett JS (2001). Gene therapy: recombinant adeno-associated virus vectors. *Current cardiology reports* 3: 43-49
10. 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
11. Gonçalves MA (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology J.* doi:10.1186/1743-422X-2-43
12. Humeau Y *et al.* (2000). How botulinum and tetanus neurotoxin block neurotransmitter release. *Biochimie* 82: 427-446
13. Montecucco C. & Schiavo G. (1995). Structure and function of tetanus and neurotoxins. *Q. Rev. Biophys.* 28: 423-472
14. Kennislink (2003) Neurotoxinen: de natuur vecht terug Internet: <http://www.kennislink.nl/publicaties/neurotoxinen-de-natuur-vecht-terug>. 19 februari 2014
15. COGEM (2007). *Semliki forest virus* vector met een transgen voor de lichte keten van botuline neurotoxine. Advies CGM/070723-02
16. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. Advies CGM/090331-03
17. COGEM (2002). Manipulatie van signaaltransductie in de hersenen. Advies CGM/020319-01
18. COGEM (2012). Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd AAV in muizen. Advies CGM/121122-02
19. Ahmed SA & Smith LA (2000). Light chain of Botulinum a neurotoxin expressed as an inclusion body from a synthetic gene is catalytically and functionally active. *J. Prot. Chem.* 19: 475-487
20. Vaidyanathan VV *et al.* (1999). Proteolysis of SNAP-25 isoforms by botulinum neurotoxin types A, C and E: Domains and amino acid residues controlling the formation of enzyme-substrate complexes and cleavage. *J. Neurochem.* 72: 327-337
21. Dong B *et al.* (2010). Characterization of genome integrity for oversized recombinant AAV vector. *Mol. Ther.* 18: 87-92