

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

DATUM 07 juli 2014
KENMERK CGM/140707-01
ONDERWERP Advies replicatiedefectieve adenovirale vector met het complete genoom van
Hepatitis B virus

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 14-023 met de titel 'Intraveneuze inductie van viremie in muizen' van TNO Triskelion B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over het inperkingsniveau waarop werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde adenovirale vector AdHBV ingeschaald moet worden. De aanvrager wil muizen te infecteren met een replicatiedefectief adenovirus waarin het genoom van *Hepatitis B virus* (HBV) is geïntroduceerd.

De COGEM heeft in het verleden geadviseerd om zowel HBV als adenovirussen in te schalen in pathogeniteitsklasse 2. Verspreiding van adenovirussen vindt plaats via de aerogene route. Verspreiding van HBV vindt voornamelijk plaats via bloed-bloed contact. Om infectieus AdHBV te verkrijgen, wordt AdHBV gekweekt op cellen die een deel van het genoom van een adenovirus bevatten en adenovirale eiwitten produceert. Vanwege de mogelijke recombinatie van het DNA van de cellen en het AdHBV acht de COGEM de kans aanwezig dat er replicatiecompetente adenovirussen (RCA) ontstaan. Wanneer deze RCA tegelijk met AdHBV een cel infecteren kunnen infectieuze AdHBV deeltjes geproduceerd worden die via de lucht verspreid kunnen worden. Daarnaast is in de wetenschappelijke literatuur beschreven dat een HBV eiwit mogelijk adenovirusreplicatie kan beïnvloeden, waardoor de COGEM niet kan uitsluiten dat AdHBV kan repliceren in humane levercellen. De COGEM adviseert daarom om werkzaamheden met AdHBV in te schalen op ML-III/DM-III.

Een eventuele omlaagschaling van de werkzaamheden naar DM-II/ML-II is mogelijk als o.a. is aangetoond dat er geen RCA aanwezig zijn en dat AdHBV niet kan repliceren in humane levercellen.

Met inachtneming van de voorgeschreven inperkingsmaatregelen en aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Replicatie defectieve adenovirale vector met het complete genoom van *Hepatitis B virus*

COGEM advies CGM/140707-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van de werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd replicatiedefectief adenovirus dat het complete genoom van *Hepatitis B virus* (HBV) bevat. De vergunningaanvraag is ingediend door TNO Triskelion B.V. en is getiteld 'Intraveneuze inductie van viremie in muizen'.

Adenoviridae

Adenovirale vectoren zijn afgeleid van adenovirussen (*Adenoviridae*, genus *Mastadenovirus*) en worden veelvuldig gebruikt als een genoverdrachtsysteem.¹ Er zijn zeven species (*Human adenovirus A - G*) waarin 54 verschillende serotypes humane adenovirussen ingedeeld zijn.¹ Adenovirussen hebben een gastheerbereik dat beperkt is tot één soort of enkele nauw verwante soorten.^{2,3}

Adenovirusdeeltjes bestaan uit een lineair dubbelstrengs DNA molecuul van ongeveer 36 kb dat wordt omgeven door een eiwitmantel.^{2,3} Het genoom van human adenovirus serotype 5 (HAdV-5), dat behoort tot *Human adenovirus C*, 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 transcriptie van de vroege genen waaronder E1A, E1B en E3, leidt tot de synthese van ongeveer 17 eiwitten. De E1A eiwitten zijn betrokken bij de inductie van virale replicatie en de E1B eiwitten beschermen de gastheercel tegen geprogrammeerde celdood (apoptose). De E3 eiwitten blokkeren onder andere de afweerreactie tegen het virus.^{2,3,4}

Adenovirussen kunnen de luchtwegen, het maag-darmstelsel en soms de ogen infecteren.⁵ Een infectie verloopt meestal asymptomatisch of met lichte verkoudheidssymptomen, zonder noodzaak tot medische behandeling.⁶

Hepatitis B virus

HBV behoort tot de familie *Hepadnaviridae*, genus *Orthohepadnavirus*. Binnen dit genus worden verschillende species onderscheiden gebaseerd op gastheertropisme.¹ De natuurlijke gastheren van HBV zijn de mens en hogere primaten.^{1,7} *Hepadnaviridae* zijn grotendeels dubbelstrengige DNA-virussen met een genoom van ruim 3 kb.¹ De virale buitenmembraan bevat drie eiwitten: S, M en L. Binnen het virale membraan bevindt zich het nucleocapside dat het genoom omvat.⁷

Infectie met HBV vindt plaats via contact met besmette lichaamsvloeistoffen. Het virus dringt binnen door de beschadigde huid of via intacte slijmvliezen.^{7,8,9} Voorbeelden hiervan zijn 'bloed-bloed' contact ten gevolge van bloedtransfusie met besmette bloedproducten en prik- en snij-accidenten met HBV-besmet materiaal.^{8,9,11} Ook overdracht van HBV van moeder naar kind tijdens de geboorte is mogelijk.⁹ Na infectie verspreidt HBV zich via het bloed door het lichaam. Door aanhechting aan specifieke receptoren wordt het virus opgenomen in levercellen waar het kan repliceren.⁷

Een infectie met HBV veroorzaakt meestal acute hepatitis, maar bij een groot deel van de geïnfecteerden wordt het virus door het afweersysteem opgeruimd zonder dat er ziekteverschijnselen optreden. Wereldwijd zijn bijna 2 miljard mensen geïnfecteerd met HBV, waarvan meer dan 350 miljoen mensen een chronische HBV-infectie hebben. Een chronische HBV-infectie kan uiteindelijk leiden tot levercirrose en leverkanker.^{7,9} Jaarlijks sterven naar schatting 1 miljoen mensen ten gevolge van een HBV infectie.^{7,10}

Wereldwijd is de prevalentie van HBV sterk verschillend.⁹ In ontwikkelingslanden waar de levensstandaard laag is en beperkte medische zorg aanwezig is, is de prevalentie hoog.⁹ In landen met een hoge levensstandaard, waaronder Nederland, is de prevalentie laag. Hepatitis veroorzaakt door HBV behoort tot de meest frequent voorkomende laboratoriuminfecties.¹¹

Vaccinatie is de meest effectieve strategie om infectie en verspreiding van HBV onder de bevolking te voorkomen. Sinds 1982 zijn Hepatitis-B-vaccins beschikbaar.⁹ Wereldwijd zijn twee behandelstrategieën erkend om chronische hepatitis te behandelen, interferon α en nucleos(t)ide analogen.¹²

Het ggo AdHBV

De aanvrager maakt gebruik van het adenovirus HAdV-5 waaruit de genen coderend voor de eiwitten E1A, E1B en E3 zijn verwijderd. Hierdoor is het virus replicatiedefectief. Op de plaats van E1A en E1B is het genoom van HBV geïntroduceerd, resulterend in het AdHBV. Het geïntroduceerde HBV bevat 1,3 keer de lengte van het genoom van HBV voor een optimale expressie van HBV. Omdat het E1 afwezig is in het genoom van het AdHBV kan het na infectie van muizencellen niet repliceren. AdHBV wordt gekweekt op 'human embryo kidney' (HEK)293 cellen. Deze cellen brengen het complete E1 tot expressie waardoor het mogelijk is om infectieuze virusdeeltjes te produceren.

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens om de infectieuze AdHBV deeltjes intraveneus aan de muizen toe te dienen. De deeltjes zullen levercellen van de muizen infecteren. Vervolgens kunnen de levercellen wild-type HBV produceren. Doordat AdHBV replicatiedeficiënt is, zal er geen verdere verspreiding plaatsvinden van het ggo. Het geproduceerde HBV kan alleen levercellen van de mens en hogere primaten infecteren. Het HBV is niet in staat om nieuwe muizenlevercellen te infecteren.

De muizen worden op verschillende momenten tijdens de studie gewogen en er zal bloed afgenomen worden ten behoeve van serumanalyse en flow cytometrie analyse. De muizencellen worden gefixeerd met 4% paraformaldehyde alvorens cytometrie analyse uitgevoerd wordt. Na het doden van de muizen worden de levers geïsoleerd en gefixeerd met formaline voordat histologische analyses plaatsvinden.

De aanvrager wil de muizen injecteren met AdHBV in een veiligheidskabinet van klasse II in een DM-II verblijf. De dieren worden gehouden in filtertopkooien in een DM-II dierverschik. De werkzaamheden met het bloed, de cellen en de weefsels van de geïnfecteerde muizen verzoekt de aanvrager uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. De open handelingen wil de aanvrager uitvoeren in een veiligheidskabinet van klasse II.

De aanvrager geeft aan dat de medewerkers die betrokken zijn bij de experimenten gevaccineerd zijn tegen HBV en beschermende HBV-specifieke antilichamen hebben. Daarnaast stelt de aanvrager voor dat de medewerkers tijdens de handelingen met de infectieuze AdHBV deeltjes een volledig gezichtsbeschermend masker met lucht-aanblaas-unit voorzien van een HEPA filter dragen.

Eerder COGEM advies

In eerdere adviezen heeft de COGEM geadviseerd over de pathogeniteitsklasse van ongekaracteriseerde adenovirussen, die geïsoleerd werden uit mensapen, en verschillende subspecies van humane adenovirussen.^{13,14} Alle door de COGEM geïnclassificeerde adenovirussen zijn voor gg-werkzaamheden ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.¹⁵

In 2010 heeft de COGEM geadviseerd dat *Hepatitis B virus* als een klasse 2 pathogeen beschouwd kan worden, omdat er een effectief vaccin is. Daarnaast kan het virus niet makkelijk in de bevolking verspreiden. Hepatitis veroorzaakt door HBV behoort tot de meest frequent voorkomende laboratoriuminfecties.¹⁶ De COGEM heeft geadviseerd om de werkzaamheden met HBV uit te voeren op ML-II inperkingsniveau, open handelingen met HBV uit te voeren in een veiligheidskabinet van klasse 2 en tijdens de werkzaamheden de handschoenen over de mouw van de werkkleding te dragen. Ook heeft de COGEM geadviseerd dat de medewerkers voldoende beschermd moeten zijn tegen HBV en dat dit op basis van analyse van HBV specifieke antistoffen moet zijn vastgesteld. Daarnaast moeten scherpe voorwerpen (naalden, glas, scalpels etc.) uit de veiligheidskabinetten geweerd worden.

Overweging en advies

Inschaling van de werkzaamheden met AdHBV

De eiwitten gecodeerd door de E1 regio van een adenovirus zijn nodig voor de replicatie van AdHBV. Voor de productie van AdHBV wordt daarom gebruik gemaakt van HEK293 cellen. In HEK293 cellen is een deel van het adenovirusgenoom aanwezig. De cellen brengen de complete E1 regio tot expressie, waardoor nieuwe AdHBV deeltjes geproduceerd kunnen worden. Gezien de homologie tussen de sequenties van de E1 regio van HEK293 en het genoom van AdHBV is het mogelijk dat er homologe recombinatie optreedt tijdens de productie van AdHBV in HEK293 cellen. Wanneer de complete E1 regio in de AdHBV geïntroduceerd wordt, kunnen er replicatiecompetente adenovirussen (RCA) ontstaan die niet langer het genoom van HBV bevatten. Hoewel deze RCA geen E3 produceren, kunnen de RCA via de aerogene route verspreiden en infecties veroorzaken. Wanneer deze RCA en een AdHBV dezelfde cel infecteren, kan door complementatie een AdHBV deeltje geproduceerd worden, dat via de lucht kan verspreiden en na infectie HBV kan produceren. Behalve deze vorm van recombinatie kan de COGEM ook andere vormen van recombinatie waarbij het complete genoom of delen van het HBV genoom behouden blijven, niet uitsluiten. Complementatie van AdHBV kan ook plaatsvinden wanneer een medewerker besmet is met een wild-type adenovirus en deze persoon AdHBV inademt. Bij deze vorm van complementatie zou aerogene verspreiding van AdHBV en dus verspreiding van HBV via een alternatieve route via de medewerker mogelijk zijn.

Eén van de argumenten waarom HBV in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld is, is dat HBV niet makkelijk onder de bevolking kan verspreiden. Wanneer infectieuze AdHBV deeltjes via de aerogene route overgedragen kunnen worden, is verspreiding makkelijker.

Daarnaast wijst de COGEM op de mogelijke rol van het HBV X-eiwit. AdHBV is replicatiedefectief omdat de eiwitten E1A en E1B ontbreken. Een belangrijke rol van E1A is het binden aan het Rb eiwit waardoor E2F wordt vrijgemaakt. Het E2F activeert de adenovirale E2 promoters, waardoor de eiwitten die nodig zijn voor virale DNA synthese geproduceerd kunnen worden. In de wetenschappelijke literatuur is beschreven dat het X eiwit van HBV mogelijk ook het E2F kan vrijmaken.¹⁷ Het X eiwit dient in HBV als een activator van transcriptie. Het gen dat codeert voor het X eiwit is aanwezig in het genoom van AdHBV. De COGEM kan hierdoor niet uitsluiten dat AdHBV kan repliceren in cellen waarin het HBV genoom tot expressie komt.

Aangezien de vorming van RCA die AdHBV kunnen completeren niet uitgesloten zijn, een medewerker een adenovirusinfectie kan doormaken, en replicatie van AdHBV in humane hepatocyten niet uitgesloten kan worden, adviseert de COGEM de werkzaamheden met AdHDV deeltjes in associatie met kleine proefdieren in te schalen op DM-III inperkingsniveau. En bij deze werkzaamheden de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- De dieren worden gehuisvest in filtertopkooien,
- Open handelingen, inclusief het openen van mogelijk besmette filtertopkooien, dienen in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd te worden,
- Het dragen van handschoenen over de mouw van de werkkleding tijdens de werkzaamheden is verplicht.

De COGEM acht het dragen van handschoenen tot over de mouw van de werkkleding noodzakelijk om te voorkomen dat het AdHBV via eventueel aanwezige wondjes het lichaam kan binnendringen en een HBV infectie kan veroorzaken.

In lijn hiermee adviseert de COGEM de *in vitro* werkzaamheden met cellen en weefsels die afkomstig zijn van met AdHBV geïnfecteerde dieren uit te voeren op ML-III inperkingsniveau onder navolging van de volgende aanvullende voorschriften:

- Open handelingen dienen in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd te worden,
- Het dragen van handschoenen over de mouw van de werkkleding tijdens de werkzaamheden is verplicht.

Voor alle werkzaamheden met AdHBV adviseert de COGEM dat de medewerkers d.m.v. vaccinatie beschermd moeten zijn tegen HBV en dat dit op basis van analyse van HBV-specifieke antistoffen moet zijn vastgesteld.

Eventuele omlaagschaling van de werkzaamheden met AdHBV

De aanvrager heeft verzocht de werkzaamheden op DM-II/ML-II in te schalen. Hij heeft voorgesteld de infectie van muizen op DM-II uit te voeren in een veiligheidskabinet van klasse II. Daarbij dient de medewerker een volledig gezichtsbeschermend masker met lucht-aanblaas-unit voorzien van een HEPA filter te dragen, te zijn gevaccineerd tegen HBV en zijn vastgesteld dat ze over voldoende antilichamen beschikken.

De COGEM wijst erop dat het toegangsbeleid tot DM/ML-III en DM/ML-II faciliteiten verschillend is. DM/ML-III faciliteiten zijn alleen toegankelijk voor het personeel dat direct bij de proef betrokken is, maar in een DM/ML-II faciliteit mogen ook medewerkers aanwezig zijn die niet direct bij de voorgenomen werkzaamheden betrokken zijn. In het geval van een incident zijn deze medewerkers niet beschermd tegen HBV. Een ander verschil tussen DM/ML-III en DM/ML-II faciliteiten is de onderdruk in een DM/ML-III faciliteit. Alle lucht wordt via een HEPA filter gezuiverd voordat de lucht wordt afgevoerd, zodat aerogene virussen niet uit het lab kunnen ontsnappen. De COGEM merkt op dat de hoogste concentratie van AdHBV aanwezig is op het moment van de toediening van AdHBV aan de muizen. Zij is van mening dat de aanwezige vrije vectordeeltjes na toediening snel afnemen.^{18,19} Hierdoor wordt kans op aerogene besmetting met het AdHBV en een eventuele HBV infectie als gevolg kleiner.

Gezien bovenstaande kan de COGEM alleen instemmen met omlaagschaling van een deel van de werkzaamheden naar DM-II/ML-II als aan een aantal aanvullende voorwaarden wordt voldaan.

De belangrijkste reden om de werkzaamheden op DM-III/ML-III in te schalen is de mogelijke aanwezigheid van RCA. Daarom moet voor omlaagschaling van de werkzaamheden uitgesloten zijn dat de dieren, bloedproducten of de weefsels replicatiecompetent AdHBV bevatten. Dit moet middels een gevalideerde en gevoelige laboratoriumtest aangetoond worden voordat omlaagschaling van de dierexperimenten naar DM-II mogelijk is. Daarnaast moet zijn aangetoond dat AdHBV niet kan repliceren in humane hepatocyten.

Vanwege de verschillen in het toegangsbeleid van DM/ML-III en DM/ML-II faciliteiten adviseert de COGEM dat alle medewerkers die aanwezig zijn in de DM/ML-II faciliteit tijdens de voorgenomen werkzaamheden gevaccineerd zijn tegen HBV en dat op basis van analyse van HBV-specifieke antistoffen moet zijn vastgesteld dat ze voldoende beschermd zijn.

Naar aanleiding van bovenstaande adviseert de COGEM dat na de toediening van AdHBV aan muizen het mogelijk is om de voorgenomen werkzaamheden op DM-II inperkingsniveau uit te voeren onder toepassing van de volgende aanvullende voorschriften:

- De dieren worden gehuisvest in filtertopkooien,
- Open handelingen, inclusief het openen van mogelijk besmette filtertopkooien, dienen in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd te worden,
- Het dragen van handschoenen over de mouw van de werkkleding tijdens de werkzaamheden is verplicht,
- Alle medewerkers die in de werkruimte aanwezig zijn tijdens de voorgenomen werkzaamheden zijn gevaccineerd tegen HBV. En op basis van de analyse van HBV-specifieke antistoffen is vastgesteld dat ze voldoende beschermd zijn,
- Er is vastgesteld dat AdHBV niet kan repliceren op humane hepatocyten,
- Middels een gevalideerde en gevoelige test is vastgesteld dat er geen RCA aanwezig zijn.

De analyse van de cellen en weefsels van dieren die op DM-II gehuisvest zijn, kan op ML-II uitgevoerd worden onder de volgende aanvullende voorschriften:

- Open handelingen dienen in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd te worden,
- Het dragen van handschoenen over de mouw van de werkkleding tijdens de werkzaamheden is verplicht,
- Alle medewerkers die in de werkruimte aanwezig zijn tijdens de voorgenomen werkzaamheden zijn gevaccineerd tegen HBV. En op basis van de analyse van HBV-specifieke antistoffen is vastgesteld dat ze voldoende beschermd zijn.

Inschaling van werkzaamheden met gefixeerde cellen en weefsels

De COGEM is van mening dat na de fixatie van de bloedcellen en de weefsels met gevalideerde methoden de werkzaamheden op een lager inperkingsniveau uitgevoerd kunnen worden. Door de gebruikte fixatiemethoden zijn de aanwezige virusdeeltjes geïnactiveerd. Hierdoor is de COGEM van mening dat de flow cytometrie analyse en de histologische analyse met de gefixeerde cellen en weefsels buiten het ML-II laboratorium kunnen plaatsvinden.

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. McConnell M.J & Imperiale, M.J. (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 15: 1022-1033
3. Knipe DM & Howley PM (2001). *Fields virology*, volume two, fourth edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
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. Vorburger SA & Hunt KK (2002). Adenoviral gene therapy. *Oncologist* 7: 46-59
6. Brew BJ & Garrick R (1987). Gliomas presenting outside the central nervous system. *Clin. Exp. Neurol.* 23: 111-117
7. Ganem D & Schneider RJ (2001). *Hepadnaviridae: The viruses and their replication*. In: *Fields Virology*, volume 2, fourth edition. Edited by Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia. 2923-3036
8. RIVM (2010). Infectieziekten A-Z. <http://www.rivm.nl/cib/infectieziekten-A-Z/infectieziekten/HepatitisB/index.jsp>
9. WHO (2002). Global Alert and Response Hepatitis. <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/en/>
10. Lau JYN & Wright TI (1993). Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet* 342: 1335-1340
11. Sewell DL (1995). Laboratory-associated infections and biosafety. *Clinical Microbiological Reviews* 8: 389-405
12. Urban S *et al.* (2010). The replication cycle of *Hepatitis B virus*. *J. of Hepatology* 52: 282-284

13. COGEM (2013). Classificatie van elf adenovirus serotypen. COGEM Advies CGM/130606-01
14. COGEM (2012). Experimenten met onbekende adenovirussen uit mensapen. COGEM Advies CGM/121210-01
15. COGEM (2013). Classificatie humaan- en dierpathogene DNA virussen. COGEM advies CGM/130917-01
16. COGEM (2010). Classificatie Hepatitis B virus en inschaling werkzaamheden genetisch gemodificeerd Hepatitis B virus. COGEM advies CGM/100706-01
17. Wang WH *et al.* (2008). Hepatitis B virus X protein via the p38MAPK pathway induces E2F1 release and ATR kinase activation mediating p53 apoptosis. *J. Biol. Chem.* 283:25455-67
18. Alemany R *et al.* (2000). Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *J. Gen. Virol.* 81: 2605-9
19. Schagen FH *et al.* (2008). Replacement of native adenovirus receptor-binding sites with a new attachment moiety diminishes hepatic tropism and enhances bioavailability in mice. *Hum. Gene Ther.* 19: 783-94