

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw S.A.M. Dijkma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 24 oktober 2016
KENMERK CGM/161024-02
ONDERWERP Advies 'Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Listeria monocytogenes*'

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 16-277_2.8-000 getiteld "Handelingen met een geattenueerde *Listeria monocytogenes* stam op inperkingsniveau 1" ingediend door de Stichting het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerde *Listeria monocytogenes* bacteriestam. De aanvrager wil een verzwakte variant van *L. monocytogenes* (ANZ-100) genetisch modificeren (gg-ANZ-100) en toedienen aan muizen.

L. monocytogenes is schadelijk voor mens en dier. Besmetting met deze bacterie gebeurt voornamelijk via voedsel en heeft maag-darm infecties tot gevolg. In mensen met een slecht werkend immuunsysteem kan infectie een dodelijke afloop hebben. Bij zwangere vrouwen kan blootstelling aan de bacterie leiden tot een foetale infectie of miskraam.

ANZ-100 is door verwijdering van twee (virulentie)genen sterk verzwakt. De aanvrager wil in deze stam sequenties inbrengen die het immuunsysteem aan moeten sporen om kankercellen te detecteren en vernietigen, en deze gemodificeerde bacterie inbrengen in muizen. De muizen worden behandeld met immuno- en radiotherapie en naderhand worden cellen en weefsels afkomstig van deze muizen geanalyseerd.

Mede op basis van eerdere studies met muizen, acht de COGEM ANZ-100 sterk verzwakt. De COGEM is van mening dat de ingebrachte sequenties in gg-ANZ-100 geen invloed hebben op de pathogeniteit.


De COGEM adviseert werkzaamheden ter vervaardiging van het ggo en werkzaamheden met cellen uit geïnfecteerde muizen in te schalen op inperkingsniveau ML-I. Voor handelingen met muizen stemt de COGEM in om de werkzaamheden in te schalen op DM-I niveau, en tijdelijke handelingen met specifieke apparatuur toe te staan op D-I niveau.

Met inachtneming van het aanvullende voorschrift om zwangere medewerkers uit te sluiten van alle werkzaamheden, acht de COGEM de risico's voor mens in milieu bij de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Listeria monocytogenes*

COGEM advies CGM/161024-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag getiteld 'Handelingen met een geattenueerde *Listeria monocytogenes* stam op inperkingsniveau 1' (IG 16-277) ingediend door de Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis. De vergunningaanvraag omvat werkzaamheden met een genetisch gemodificeerde (gg-) *Listeria monocytogenes* stam. De aanvrager wil gg-*L. monocytogenes* toedienen aan muizen, de muizen vervolgens bestralen en weefsels analyseren. De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met deze gg-bacterie.

2. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes is een grampositieve, staafvormige bacterie die pathogeen is voor mens en dier.¹ De bacterie komt van nature wijdverspreid voor in het milieu (bodem, water, planten) en kan ook aangetroffen worden in voedsel. Deze bacteriesoort is in staat om bij een brede reeks van temperaturen (van -1.7 tot 45°C) te overleven en repliceren.² Besmetting met *L. monocytogenes* vindt plaats via de voedselketen en is een van de meest voorkomende oorzaken van voedselvergiftiging bij de mens. Mensen met een normaal functionerend afweersysteem ontwikkelen meestal alleen een milde gastro-enteritis na besmetting met de bacterie. Besmetting bij ouderen, chronisch zieken en mensen met een verzwakt immuunsysteem kan echter leiden tot de infectieziekte listeriosis.³ Deze ziekte kan hersenvliesontsteking en bloedvergiftiging veroorzaken met een mogelijk dodelijke afloop. Een tweede risicogroep zijn zwangere vrouwen en hun ongeboren kinderen, omdat *L. monocytogenes* de placenta-barrière kan passeren en hierdoor ernstige foetale infecties kan veroorzaken, wat kan leiden tot een miskraam of doodgeboorte.^{3,4,5}

2.1 Virulentiefactoren

Het ziekteverwekkende vermogen van *L. monocytogenes* wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van verschillende virulentiefactoren, zoals 'Actin assembly-inducing protein' (ActA; een celoppervlakte-eiwit betrokken bij de verspreiding van cel naar cel) en 'internalin' (InI; celoppervlakte-eiwitten betrokken bij het binnendringen van de cel). *L. monocytogenes* dringt gastheercellen binnen via fagocytose. Opname in gastheercellen die niet in staat zijn tot fagocytose, gebeurt door binding van internalin B (InIB) aan de gastheer-receptor, wat leidt tot de opname van de bacterie in een fagosoom. Eenmaal in de cel scheidt *L. monocytogenes* verschillende virulentiefactoren uit, waardoor de fagosoom lyseert en de bacterie zich vrij kan vermenigvuldigen in het cytosol.⁴ Intercellulaire verspreiding van *L. monocytogenes* wordt gemedieerd door de virulentiefactor ActA. Het eiwit induceert actine-polymerisatie in het cytosol van de gastheercel en dit stelt de bacterie in staat om zich via de actine-filamenten door de cel en het celmembraan te verspreiden naar omliggende cellen. Deze

gezamenlijke virulentiefactoren maken *L. monocytogenes* een efficiënt pathogeen doordat het in staat is om zich intracellulair te vermenigvuldigen en hierdoor kan ontsnappen aan het immuunsysteem.⁴

2.2 Geattenueerde deletiemutant (ANZ-100)

De aanvrager wil gebruik maken van een geattenueerde *L. monocytogenes* stam, waarbij de virulentiegenen *actA* en *inIB* zijn gedeleteerd. Deze stam staat bekend als ANZ-100. Door de deletie van *actA* is de bacterie niet meer in staat om zich van cel tot cel te verspreiden. Deletie van *inIB* zorgt ervoor dat non-fagocyten, zoals hepatocyten, minder goed geïnfecteerd kunnen worden.⁶ In een recente publicatie wordt gesteld dat door de gecombineerde deletie van zowel *actA* als *inIB* deze stam een duizendvoudige attenuatie ten opzichte van het wildtype *L. monocytogenes* heeft in muizen.⁶

3. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft *L. monocytogenes* in 2011 ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.⁷ In 2000 heeft de COGEM een advies uitgebracht over kloneringswerkzaamheden van gekarakteriseerde *L. monocytogenes* sequenties in *Escherichia coli*. Zij adviseerde deze werkzaamheden in te schalen op ML-I inperkingsniveau. Tevens adviseerde zij kloneringswerkzaamheden met *L. monocytogenes* sequenties in *L. monocytogenes* onder ML-II inperkingsniveau uit te voeren met daarbij het aanvullende advies zwangere vrouwen van de werkzaamheden uit te sluiten.⁸

4. Voorgenomen werkzaamheden met gg- ANZ-100

De aanvrager wil werkzaamheden uitvoeren met de genetisch gemodificeerde deletiemutant (gg-ANZ-100). De werkzaamheden bestaan uit de vervaardiging van het ggo, de huisvesting van en handelingen met gg-ANZ-100 geïnfecteerde muizen, tijdelijke handelingen (radiotherapie) met gg-ANZ-100 geïnfecteerde muizen, en werkzaamheden met cellen afkomstig van gg-ANZ-100 geïnfecteerde muizen.

4.1 gg-ANZ-100 *in vitro*

De aanvrager is voornemens om met behulp van de pPL2 vector (een site-specific phage integration vector⁹) en een afgeleide van deze vector (een vector waarbij het antibioticaresistentiegen gericht is op erythromycine in plaats van chloramphenicol) sequenties te introduceren in ANZ-100 die coderen voor tumor-specifieke T-cel epitopen. Deze sequenties zullen van verschillende organismen afkomstig zijn, zoals een virus, kip, muis of mens. Het gg-ANZ-100 zal vervolgens toegediend worden aan muizen. Aan het einde van de studie worden de muizen opgeofferd en worden cellen, weefsels en bloed geanalyseerd met onder andere flowcytometrie en immunohistochemie. De aanvrager geeft aan dat de te introduceren genen niet coderen voor schadelijke genproducten en stelt voor om de *in vitro* werkzaamheden in te schalen op inperkingsniveau ML-I.

4.2 gg-ANZ-100 *in vivo*

Het gg-ANZ-100 zal intraveneus of intraperitoniaal toegediend worden aan wildtype en gg-muizen. De gg-muizen hebben verstoringen in de immuuncelregulatie en een aangepaste kankergevoeligheid. De gg-muizen zijn niet vervaardigd met een viraal systeem en worden gehanteerd op D-I

inperkingsniveau. De handelingen met muizen betreffen het verschonen, wegen, injecteren en het meten van tumoren. Daarnaast zullen de geïnfecteerde muizen behandeld worden met radiotherapie (bestraling) en immunotherapie. In een later stadium zal, indien nodig, chemotherapie toegepast worden of worden tumor-specifieke (gemodificeerde) T-cellen toegediend. De aanvrager stelt voor om de *in vivo* werkzaamheden in te schalen op inperkingsniveau D-I.

5. Overweging en advies

De aanvrager is van plan om gg-ANZ-100 te gebruiken in een studie in muizen. Vanwege het potentiële gezondheidsrisico bij een eventuele besmetting van zwangere medewerkers, stelt de aanvrager voor dat deze worden uitgesloten van deelname aan de voorgenomen *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden.

5.1 Laboratoriumwerkzaamheden met ANZ-100 en gg-ANZ-100

De aanvrager is voornemens om sequenties van tumor-specifieke T-cel epitopen te introduceren in de deletiemutant ANZ-100. ANZ-100 heeft een duizendvoudige verminderde pathogeniteit (bepaald op basis van de letale-dosismediaan, LD50) dan wildtype *L. monocytogenes* in muizen en een verminderd tropisme voor hepatocyten.⁶ Ook blijkt uit een studie van de producent van ANZ-100 dat orale toediening van 1×10^8 colony forming units (CFU) ANZ-100 in immuungecompromitteerde muizen (muizen met 'severe combined immunodeficiency' (SCID)) leidde tot een sterke reductie van infecties in de milt en lever, in vergelijking met blootstelling aan wildtype *L. monocytogenes*. Na 7 dagen kon ANZ-100, in tegenstelling tot wildtype *L. monocytogenes*, niet meer gedetecteerd worden in SCID muizen, zelfs bij een hoge dosis van 1×10^9 CFU.

ANZ-100 is ook in fase I en fase II klinische studies gebruikt.^{10,11,12} In een fase I klinische studie is in ANZ-100 humaan mesotheline (*hMeso38*) tot expressie gebracht. Deze stam staat bekend als CRS-207. In deze studie werd ofwel ANZ-100, of CRS-207 intraveneus toegediend in concentraties van maximaal 3×10^8 CFU aan 26 patiënten met verschillende typen kanker (pancreas, mesotheloom, long en ovarium). ANZ-100 werd vanaf dag 1 niet teruggevonden in bloed, feces, urine of sputum. CRS-207 werd in 21-daagse intervallen toegediend aan patiënten, met maximaal 4 doseringen. In de patiënten werd maximaal 4 dagen na de eerste toediening CRS-207 teruggevonden in eerdergenoemde monsters. Bij de 2^e infusie werd slechts bij één persoon op dag 4 nog CRS-207 waargenomen. Alle overige en opvolgende monsters waren negatief.¹⁰ In een andere klinische studie is een Influenza A nucleoproteïne (NP) tot expressie gebracht in ANZ-100. Bij toediening van deze ggo in concentraties van 1×10^8 CFU in 10 gezonde vrijwilligers werd tot maximaal 3 dagen na blootstelling *L. monocytogenes* teruggevonden in fecale monsters. Bij een hogere dosering van 1×10^{10} CFU werd tot maximaal 5 dagen na blootstelling *L. monocytogenes* teruggevonden in fecale monsters.¹¹ Er werden geen tot slechts zeer milde bijwerkingen gerapporteerd in de gezonde vrijwilligers.

Op grond van het bovenstaande is de COGEM van mening dat ANZ-100 sterk geattenuëerd is en een sterk verminderde pathogeniteit heeft in vergelijking met wildtype *L. monocytogenes*. ANZ-100 geeft geen persistente infectie in muizen en uit klinische studies volgt dat ook bij mensen (gg-)ANZ-100 na korte tijd niet meer gedetecteerd kan worden. De COGEM ziet geen reden om aan te nemen dat de

introductie van tumor-specifieke T-cel epitopen in ANZ-100 invloed heeft op de pathogeniteit van ANZ-100. De COGEM is van mening dat de voorgestelde werkzaamheden met zowel ANZ-100 als gg-ANZ-100 uitgevoerd kunnen worden onder ML-I inperkingsniveau.

De kans dat ANZ-100 of gg-ANZ-100 revertiert naar wildtype *L. monocytogenes* acht de COGEM zeer klein, aangezien het 'in frame', dubbele, en onafhankelijke deleties betreft, en deze deleties op verschillende plaatsen in genoom voorkomen. Reversie naar wildtype *L. monocytogenes* is niet gerapporteerd in de eerdergenoemde klinische studies.

5.2 Handelingen met muizen in associatie met gg-ANZ-100 en animale cellen

De aanvrager is voornemens om gg-ANZ-100 toe te dienen aan (gg-)muizen en hier vervolgens handelingen mee uit te voeren, zoals wegen en injecteren. De (gg-)muizen zullen na toediening van gg-ANZ-100 ook behandeld worden met radiotherapie. De apparatuur voor deze behandeling is alleen beschikbaar op een D-I laboratorium.

Uit de eerdergenoemde studie van de producent van ANZ-100 is gebleken dat na 7 dagen volledige klaring plaatsvindt in SCID muizen bij toediening van een maximale dosis van 1×10^7 CFU intraveneus/intraperitoneaal (die volgens de gegevens van de producent vergelijkbaar wordt geacht met 1×10^9 CFU oraal). Aan de hand van deze gegevens is de COGEM van mening dat met gg-ANZ-100-behandelde muizen na 7 dagen vrij zullen zijn van gg-ANZ-100 en dat de muizen daarom op inperkingsniveau D-I gehuisvest kunnen worden.

Voorafgaand aan deze 7 dagen is gg-ANZ-100 mogelijk nog aanwezig. Aangezien de bacterie sterk geattenuëerd is, in muizen geen persistente infectie ontstaat, en de kans dat gg-ANZ-100 mensen met een normale immunofunctie kan infecteren uiterst klein is, acht de COGEM inschaling op inperkingsniveau D-I met de werkvoorschriften van inperkingsniveau DM-I voldoende om de veiligheid te waarborgen. Echter realiseert de COGEM zich dat volgens de Regeling GGO werkzaamheden met de combinatie van een micro-organisme en een dier ingeschaald worden op inperkingsniveau DM-I.

Na de vervaardiging van het ggo en de handelingen met muizen in associatie met gg-ANZ-100, is de aanvrager voornemens analyses uit te voeren op cellen en weefsels van de geïnfecteerde muizen. Gezien de bovengenoemde sterke attenuatie van ANZ-100 in vergelijking met wildtype *L. monocytogenes* en de verwachte lage pathogeniteit van het gg-ANZ-100, adviseert de COGEM werkzaamheden met animale cellen in te schalen op inperkingsniveau ML-I.

5.3 Gezondheidsrisico voor de foetus (bij zwangere medewerkers)

Van *L. monocytogenes* is bekend dat de bacterie de placenta-barrière kan passeren en een foetale infectie of miskraam kan veroorzaken. De COGEM is van mening dat er op basis van beschikbare literatuur onvoldoende bewijs is voor de apathogeniteit van ANZ-100 en gg-ANZ-100 voor zwangere vrouwen. De COGEM adviseert daarom om zwangere vrouwen uit te sluiten van alle *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met ANZ-100 en gg-ANZ-100.

6. Conclusie

Indien de voorgenomen werkzaamheden op de geadviseerde inperkingniveaus en onder navolging van de genoemde aanvullende voorschriften worden uitgevoerd, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Orsi RH & Wiedmann M (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl. Microbiol. Biotech.* 100: 5273-5287
2. Membré J-M *et al.* (2005). Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. *Int. J. Food Microbiol.* 100: 179-86
3. Allerberger F & Wagner M (2010). Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 16: 16-23
4. Calame DG *et al.* (2016). Innate and adaptive immunologic functions of complement in the host response to *Listeria monocytogenes* infection. *Immunobiology*, doi: 10.1016/j.imbio.2016.07.004. [Epub ahead of print]
5. Vazquez-Boland JA *et al.* (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 584-640
6. Brockstedt DG *et al.* (2004). *Listeria*-based cancer vaccines that segregate immunogenicity from toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 13832-13837
7. COGEM (2011). Classificatie pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-03
8. COGEM (2000). Advies kennisgeving GGO 00-205. COGEM advies CGM/001211-01
9. Lauer P *et al.* (2002). Construction, Characterization, and use of two *Listeria monocytogenes* site-specific phage integration vectors. *Journal of Bacteriology*, 184: 4177-4186
10. Le DT *et al.* (2012). A live-attenuated listeria vaccine (ANZ-100) and a live-attenuated listeria vaccine expressing mesothelin (CRS-207) for advanced cancers: Phase 1 studies of safety and immune induction. *Clin. Cancer Res.* 18: 858-868
11. Johnson PV *et al.* (2011). Attenuated *Listeria monocytogenes* vaccine vectors expressing influenza A nucleoprotein: preclinical evaluation and oral inoculation of volunteers. *Microbiol. Immunol.* 55: 304-317
12. Worldwide clinical trials registry and results database. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=CRS-207&Search=Search> (bezocht 13 oktober 2016)