

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Waterstaat  
Mevrouw drs. S. van Veldhoven-van der Meer  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 01 februari 2018  
**KENMERK** CGM/180201-01  
**ONDERWERP** Advies classificatie bocavirussen en inschaling werkzaamheden met gg-AAV-bocavirus vectordeeltjes

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier IG 17-268\_2.8-000 getiteld 'Activiteiten met genetisch gemodificeerde organismen binnen het Hubrecht instituut: inperkingsniveau II-k, AAV-BoV virale vector' (IG 17-268) ingediend door het Hubrecht Instituut, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie van humaan bocavirus type 1-4 (HBoV-1, -2, -3, -4) en gorilla bocavirus (GBoV). Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) Adeno-associated virus (AAV) vectordeeltjes. Deze vectordeeltjes bevatten de capsid-eiwitten van de bocavirussen en zullen gebruikt worden om humane organoïden (mini-orgaantjes) te infecteren.

De bocavirussen zijn geassocieerd met luchtwegaandoeningen (HBoV-1) bij mensen, en maag-darmklachten bij mensen (HBoV-1, -2, -3, -4) en gorilla's (GBoV-1). GBoV-2 is aangetroffen in ontlasting van gezonde gorilla's. Aangezien de bocavirussen hoofdzakelijk geassocieerd zijn met milde ziektegevallen en de HBoVs endemisch zijn, is de COGEM van oordeel dat HBoV-1, -2, -3 en -4, GBoV-1 en -2 ingedeeld kunnen worden in pathogeniteitsklasse 2

Op basis van het apathogene karakter van AAV en de langdurige ervaring met AAV-productiesystemen, is de COGEM van oordeel dat de voorgenomen werkzaamheden op ML-I inperkingsniveau uitgevoerd kunnen worden. Onder genoemde voorwaarden, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van 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 IenW

# **Classificatie bocavirussen en inschaling werkzaamheden met gg-AAV-bocavirus vectordeeltjes**

## **COGEM advies CGM/180201-01**

### **1. Inleiding**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag getiteld ‘Activiteiten met genetisch gemodificeerde organismen binnen het Hubrecht instituut: inperkingsniveau II-k, AAV-BoV virale vector’ (IG 17-268). De adviesvraag betreft de pathogeniteitsclassificatie van humaan bocavirus (HBoV) type 1-4 en gorilla bocavirus (GBoV) en de inschaling van werkzaamheden met AAV vectordeeltjes welke zijn gespeudotypeerd met de capsid-eiwitten van HBoV-1, -2, -3, -4 of GBoV.

### **2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)**

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

- a) het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant;
- b) het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
- c) het micro-organisme behoort tot een soort die vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie;
- d) van het micro-organisme is het niet-virulente karakter door middel van adequate tests aangetoond

Een indeling in pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 3 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 4 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

### 3. Bocaparvovirussen

HBoV-1, -2, -3, -4 en GBoV zijn bocaparvovirussen, welke behoren tot de familie *Parvoviridae* en het genus *Bocaparvovirus*.<sup>1</sup> GBoV<sup>a</sup> kan onderscheiden worden in twee genotypes, GBoV-1 en GBoV-2.<sup>2,3</sup> De ‘International Committee on Taxonomy of Viruses’ (ICTV) heeft GBoV-2 nog niet als subtype erkend.<sup>1</sup> Sequentie- en fylogenetische analyses wijzen er op dat GBoV-2 het meest verwant is aan de genotypes HBoV-2 en HBoV-4, welke behoren tot de soort *Primate bocaparvovirus 2*.<sup>3</sup> GBoV-1 behoort net als HBoV-1 en HBoV-3 tot de soort *Primate bocaparvovirus 1*. Virussen behorende tot de soorten *Primate bocaparvovirus 1* en *Primate bocaparvovirus 2* infecteren humane en niet-humane primaten.<sup>3</sup>

Bocaparvovirussen zijn enkelstrengs lineaire DNA virussen, met een genoom van circa 4,9-5,5 kb. Het virale genoom bevat drie ‘open reading frames’ (ORF’s): het eerste ORF codeert voor één groot niet-structureel eiwit (NS1). Het middelste ORF komt binnen de familie *Parvoviridae* alleen voor bij bocaparvovirussen en codeert voor een nucleair fosfoproteïne (NP1).<sup>3,10,12</sup> Het laatste ORF codeert voor twee structurele virale capsid-eiwitten (VP1 en VP2) die via alternatieve ‘splicing’ kunnen worden gevormd.

#### 3.1 Humane bocavirussen

Het eerst geïdentificeerde humane bocavirus (HBoV-1), is in 2005 aangetroffen in nasofaryngeale secreties van kinderen met lage luchtweginfecties.<sup>4</sup> In 2009 en 2010 zijn drie additionele HBoV subtypes ontdekt genaamd HBoV-2 HBoV-3 en HBoV-4.<sup>5,6,7</sup>

HBoVs zijn aangetroffen in verschillende biologische monsters, waaronder faeces, bloed, tonsillaire lymfocyten, saliva en urine, maar ook in rivierwater en het riool.<sup>10,12</sup> Humane bocavirussen zijn endemisch en worden wereldwijd waargenomen in de humane populatie.<sup>11,12</sup> De pathogeniteit van HBoV is slecht gekarakteriseerd, omdat er geen goede diermodellen zijn en het virus moeilijk replicateert in celkweken.<sup>12</sup> HBoV mono-infecties komen niet vaak voor. Meestal is er sprake van co-infectie met andere luchtweg- en maag-darmpathogenen zoals rhinovirus, adenovirus, norovirus, rotavirus en Human respiratory syncytial virus.<sup>10,11,12</sup> Ook zijn de transmissieroutes van humane bocavirussen niet bekend.<sup>10</sup> De seroprevalentie van HBoV is leeftijdsafhankelijk en ligt rond de 40% bij kinderen tussen 18-23 maanden en rond de 96% bij volwassenen.<sup>8,12</sup>

HBoV-2, -3 en -4 worden voornamelijk aangetroffen in ontlasting van kinderen met acute gastro-enteritis. Infecties met HBoV-2, HBoV-3 en HBoV-4 blijken, op basis van serologisch onderzoek, minder vaak voor te komen dan HBoV-1.<sup>8,12</sup> Echter uit dergelijk onderzoek blijkt ook dat de seroprevalentie van HBoVs bij patiënten met gastro-enteritis vergelijkbaar is met die van gezonde

---

<sup>a</sup> In de onderhavige vergunningaanvraag (IG 17-268) wordt gesproken over GBoV. Er zijn echter inmiddels twee GBoV genotypes bekend: GBoV-1 en GBoV-2.<sup>2,3</sup> Hoewel de vergunningaanvraag vermoedelijk alleen betrekking heeft op GBoV-1, zal ook GBoV-2 in dit advies worden betrokken.

controlegroepen.<sup>9,12</sup> Daarnaast is er vaak sprake van co-infectie met andere gastro-intestinale virussen.<sup>10,11,12</sup> Het is om deze redenen en vanwege het beperkt aantal studies dat is uitgevoerd, nog onduidelijk of HBoV-2, HBoV-3 en HBoV-4 van zichzelf ziekmakend zijn.

HBoV-1 treft voornamelijk jonge kinderen van 6 tot 24 maanden oud met luchtwegaandoeningen, maar komt ook voor bij volwassenen en bij patiënten met gastro-enteritis.<sup>12,14</sup> Een HBoV-1 infectie is waarschijnlijk systemisch van aard en viraal DNA kan worden aangetroffen in serum.<sup>10</sup> HBoV-1 wordt lange tijd uitgescheiden en in de nasofarynx van immunocompetente individuen kan tot 6 maanden na infectie HBoV-1 DNA gedetecteerd worden.<sup>10,12,13</sup> Zoals eerder gezegd komt co-infectie met andere virussen en bacteriën vaak voor bij HBoV-1 positieve patiënten.<sup>10,12,14</sup> Daarnaast komt HBoV-1 ook vaak voor bij asymptomatische dragers.<sup>10,11,12,14</sup> Er zijn echter ook gevallen beschreven waarbij HBoV-1 (in de afwezigheid van andere pathogenen) in immunologische naïeve individuen (meestal kinderen) aanleiding gaf tot ernstige acute luchtweginfectie.<sup>12,15</sup> Deze ernstige infecties gaan gepaard met hoge virale loads en ademhalingsinsufficiëntie, waardoor opname op de intensive care noodzakelijk kan zijn.

### **3.1 Gorilla bocavirussen**

In 2010 is een aan HBoV gerelateerd virus, gorilla bocavirus (GBoV-1; voorheen GBoV), in ontlastingsmonsters van gorilla's met acute enteritis geïdentificeerd.<sup>2</sup> Vervolgens is er in 2017 een tweede gorilla bocavirus geïdentificeerd, gorilla bocaparvovirus 2 (GBoV-2).<sup>3</sup> GBoV-2 is geïsoleerd uit faeces van twee jonge (< 3 jaar) gezonde gorilla's. Fylogenetische analyse wijst er verder op dat er regelmatig intra- en interspecies recombinaties hebben plaatsgevonden binnen de groep van primate bocavirussen.<sup>3</sup> Voor beide gorilla bocavirussen geldt dat op dit moment onbekend is of deze virussen ziekte kunnen veroorzaken bij gorilla's of andere primaten (inclusief de mens).

## **4. Adeno-associated dependoparvovirus A**

*Adeno-associated dependoparvovirus A* (AAV; voorheen Adeno-associated virus) behoort tot de familie *Parvoviridae* en het genus *Dependoparvovirus*.<sup>16</sup> Het is een enkelstrengs DNA virus met een genoom van circa 4,7 kb. Het genoom codeert twee genen, *rep* en *cap*. Het *rep* gen codeert de replicase eiwitten (Rep) 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 mantel-eiwitten (Cap). De *rep* en *cap* genen worden geflankeerd door twee 'inverted terminal repeats' (ITR's), die noodzakelijk zijn voor DNA-replicatie en integratie van het DNA in een chromosoom van de gastheer. Voor efficiënte replicatie van AAV is co-infectie met een helpervirus nodig, zoals een adenovirus of een herpesvirus.<sup>17,18,19</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>17</sup> Er zijn verschillende serotypes van AAV (AAV-1 - 13) bekend die onder andere verschillen vertonen in gastheerspecificiteit en weefsel-tropisme.<sup>17,20</sup> Infecties met AAV komen wereldwijd en frequent voor (80% van de humane populatie is seropositief voor AAV-2), maar gaan voor zover bekend niet gepaard met ziekteverschijnselen.<sup>21</sup> Overdracht van het virus vindt waarschijnlijk plaats via de respiratoire of gastro-intestinale route.<sup>17</sup>



## 5. Voorgenomen werkzaamheden

Voor het onderzoek wil de aanvrager gebruik maken van replicatie-deficiënte gg-AAV vectordeeltjes die gepseudotypeerd zijn met de capsid-eiwitten van HBoV-1, -2, -3 -4 of GBoV<sup>a</sup>. Het doel is om met behulp van deze gg-AAV-deeltjes, humane organoïden te transduceren met ‘green fluorescent protein’ (GFP). De productie van de vectordeeltjes vindt elders plaats en valt niet onder deze vergunningaanvraag. Voor de productie van gg-AAV-bocavirus vectordeeltjes heeft de aanvrager HEK293(T) cellen getransfecteerd met meerdere plasmiden met daarop de capsid-genen van HBoV-1, -2, -3, -4 of GBoV<sup>a</sup>, de replicatie genen van AAV-2 en de benodigde adenovirus genen.

## 6. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over virussen behorende tot het genus *Bocaparvovirus*. Wel heeft de COGEM verscheidene virussen behorende tot de familie *Parvoviridae*, waaronder verschillende subspecies van AAV, geïdentificeerd en ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.<sup>22</sup>

De COGEM heeft regelmatig geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met vergelijkbare AAV vectorsystemen (zie bijvoorbeeld <sup>23,24,25,26</sup>). In het laatste advies uit 2016 heeft de COGEM geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met gg-AAV in combinatie met muizen en ratten.<sup>26</sup> Op basis van de minieme sequentieoverlap tussen de verschillende plasmiden of tussen de recombinant baculovirussen in de te gebruiken productiesystemen, de langdurige ervaring met de beschreven productiesystemen en de garantie dat de productiecellen vrij waren van wildtype AAV en helpervirussen, achtte de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat gedurende de productie replicatie-competent AAV zou ontstaan. Mede op basis hiervan kon de COGEM ermee instemmen als de met gg-AAV geïnjecteerde dieren na een week werden teruggeplaatst naar D-I.

## 7. Classificatie door andere beoordelende instanties

HBoV-1, -2, -3, -4, GBoV-1 en -2 zijn in België, Zwitserland en de Verenigde Staten nog niet geïdentificeerd. De Duitse risicobeoordelingsinstantie ‘Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin’ (BAuA) heeft HBoV-1, -2 en -3 ingedeeld in risicogroep 2.<sup>27</sup>

De inschaling door deze buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

## 8. Overweging en advies

### 8.1 Classificaties HBoV-1, -2, -3, -4, GBoV-1 en -2

Humane bocavirussen komen wereldwijd voor en zijn endemisch. De humane bocavirussen zijn geassocieerd met luchtwegaandoeningen (HBoV-1) en gastro-enteritis (HBoV-1, -2, -3 en -4) voornamelijk bij jonge kinderen. Vaak is er hierbij sprake van co-infectie met andere virale en bacteriële pathogenen. Een HBoV-1 infectie verloopt doorgaans asymptomatisch, maar kan in enkele gevallen ernstige ziekte veroorzaken.

De gorilla bocavirussen zijn aangetroffen in ontlasting van gorilla’s met acute enteritis (GBoV-1) en in ontlasting van gezonde gorilla’s (GBoV-2). Voor beide gorilla bocavirussen geldt dat op dit

onbekend is of deze virussen ziekte kunnen veroorzaken bij gorilla's of andere primaten (inclusief de mens).

Aangezien de bocavirussen hoofdzakelijk geassocieerd zijn met milde ziektegevallen en de HBoVs endemisch zijn, is de COGEM van oordeel dat HBoV-1, -2, -3 en -4, GBoV-1 en -2 ingedeeld kunnen worden in pathogeniteitsklasse 2.

### **8.2 Inschaling werkzaamheden**

De aanvrager is voornemens humane organoïden te infecteren met gg-AAV vectordeeltjes waarin GFP is gekloneerd welke gepseudotypeerd zijn met de capsid-eiwitten van HBoV-1, -2, -3, -4 of GBoV<sup>a</sup>. De aanvrager geeft in de onderhavige vergunningaanvraag aan de *in vitro* werkzaamheden uit te willen voeren op ML-II inperkingsniveau.

De aanvrager is voornemens gebruik te maken van replicatiedeficiënte gg-AAV vectordeeltjes, welke zelfs in aanwezigheid van een helpvirus niet in staat zijn tot replicatie. De COGEM acht (gezien het productiesysteem) de kans op de aanwezigheid van replicatie-competent AAV in de te gebruiken batches verwaarloosbaar klein.

Op basis van het apathogene karakter van AAV (geen schadelijke effecten, beperkte blootstelling en verspreiding) en de langdurige ervaring met de beschreven replicatiedeficiënte AAV-productiesystemen, is de COGEM van oordeel dat de voorgenomen werkzaamheden ingeschaald kunnen worden op ML-I inperkingsniveau zonder aanvullende voorschriften.

### **Referenties**

1. International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://data.ictvonline.org/proposals/2013.001a-aaaV.A.v4.Parvoviridae.pdf> (bezocht: 19 januari 2018)
2. Kapoor A *et al.* (2010). Identification and characterization of a new bocavirus species in gorillas. *PLoS One* 5: e11948. doi: 10.1371/journal.pone.0011948
3. Nze-Nkogue C *et al.* (2017). Identification and molecular characterization of novel primate bocaparvoviruses from wild western lowland gorillas of Moukalaba-Doudou National Park, Gabon. *Infect. Genet. Evol.* 53: 30-37
4. Allander T *et al.* (2005). Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 12891-12896
5. Kapoor A *et al.* (2009). A newly identified bocavirus species in human stool. *J. Infect. Dis.* 199: 196-200
6. Arthur JL *et al.* (2009). A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog.* 4: e1000391. doi: 10.1371/journal.ppat.1000391
7. Kapoor A *et al.* (2010). Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J. Infect. Dis.* 201: 1633-1643
8. Kantola K *et al.* (2011). Seroepidemiology of human bocaviruses 1-4. *J. Infect. Dis.* 204: 1403-1412
9. De R *et al.* (2017). Risk of acute gastroenteritis associated with human bocavirus infection in children: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 12: e0184833. doi: 10.1371/journal.pone.0184833
10. Jartti T *et al.* (2012). Human bocavirus-the first 5 years. *Rev. Med. Virol.* 22: 46-64

11. Ong DS *et al.* (2016). Human bocavirus in stool: A true pathogen or an innocent bystander? *J Clin. Virol.* 74: 45-49
12. Guido M *et al.* (2016). Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J. Gastroenterol.* 22: 8684-8697
13. Martin ET *et al.* (2015). Human Bocavirus 1 Primary Infection and Shedding in Infants. *J. Infect. Dis.* 212:516-24.
14. Wang K *et al.* (2010). Correlation between bocavirus infection and humoral response, and co-infection with other respiratory viruses in children with acute respiratory infection. *J. Clin. Virol.* 47: 148-155
15. Moesker *et al.* (2015). Human bocavirus infection as a cause of severe acute respiratory tract infection in children. *Clin. Microbiol. Infect.* 21(10):964.e1-8. doi: 10.1016/j.cmi.2015.06.014
16. International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 24 januari 2018)
17. Tijssen P *et al.* (2012). Family *Parvoviridae*. In: *Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
18. Muzyczka N & 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
19. Smith-Arica JR & Bartlett JS (2001). Gene therapy: recombinant adeno-associated virus vectors. *Current cardiology reports* 3: 43-49
20. 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
21. Gonçalves MA (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology J.* doi:10.1186/1743-422X-2-43
22. COGEM (2017). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/170522-03
23. COGEM (2002). Manipulatie van signaaltransductie in de hersenen. COGEM advies CGM/020319-01
24. COGEM (2012). Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd AAV in muizen. COGEM advies CGM/121122-02
25. COGEM (2014). Inschaling gg-lentivirus en gg-AAV coderend voor botuline of tetanus toxine. COGEM advies CGM/140224-01
26. COGEM (2016). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde-AAV geïnfecteerde muizen en ratten. COGEM advies CGM/161108-01
27. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA). TRBA 462 „Einstufung von Viren in Risikogruppen“ [https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-462.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-462.pdf?__blob=publicationFile) (bezocht: 22 januari 2018)