

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

DATUM 16 maart 2018
KENMERK CGM/180316-01
ONDERWERP Advies inschaling replicatie-deficiënte adenovirale vectorsystemen

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

De COGEM heeft een onderzoek laten uitvoeren naar de milieurisico's van werkzaamheden onder ingeperkt gebruik met vectoren gebaseerd op biologisch ingeperkt adenovirussen en *Adeno-associated virus*. Op grond van het onderzoeksrapport komt zij met betrekking tot op adenovirus gebaseerde vectoren tot het volgende advies.

Samenvatting:

Bij biomedisch onderzoek wordt veel gebruik gemaakt van vectorsystemen gebaseerd op adenovirussen. De afgelopen jaren zijn er steeds geavanceerdere op deze virussen gebaseerde vectorsystemen ontwikkeld. Tevens neemt de kennis over en ervaring met deze systemen toe. Ter stroomlijning van de vergunningverlening heeft de COGEM laten onderzoeken of activiteiten met deze vectorsystemen voor generieke omlaagschaling in aanmerking kunnen komen.

Op basis van het resulterende onderzoeksrapport onderscheidt de COGEM drie adenovirale vectorsystemen. Voor elk van deze systemen adviseert de COGEM op welk inperkingsniveau de productie van en werkzaamheden met deze vectoren uitgevoerd kunnen worden. Met betrekking tot de werkzaamheden maakt ze daarbij onderscheid tussen laboratoriumexperimenten en experimenten met proefdieren.



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

Generiek advies inschaling replicatie-deficiënte adenovirale vectorsystemen

COGEM advies CGM/180316-01

1. Introductie

Bij de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) onder ingeperkt gebruik (laboratoria, dierverblijven etc.), is de pathogeniteitsklasse van het uitgangsgenorganisme leidend. Omlaagschaling van werkzaamheden kan onder meer als het ggo biologisch ingeperkt of verminderd pathogeen is. De COGEM adviseert naar aanleiding van vragen van de vergunningverlener regelmatig dat werkzaamheden met biologisch ingeperkte virussen^a op een lager veiligheidsniveau uitgevoerd kunnen worden zonder dat de veiligheid van mens en milieu in het geding komt.

Bij biomedisch onderzoek wordt veel gebruik gemaakt van vectorsystemen gebaseerd op adenovirussen (AdV) en adeno-associated virussen (AAV). De afgelopen jaren zijn er steeds geavanceerdere op AdV- en AAV-gebaseerde vectorsystemen ontwikkeld. Daarnaast neemt kennis over en ervaring met deze systemen toe. Ter stroomlijning van de vergunningverlening heeft de COGEM literatuuronderzoek laten uitvoeren om te kunnen bepalen of werkzaamheden met deze vectorsystemen voor generieke omlaagschaling in aanmerking kunnen komen. Het project is uitgevoerd door Ameco Adviesgroep Milieubeleid in samenwerking met het Erasmus Medisch Centrum en het Nederlands Herseninstituut.

Op basis van de informatie in het resulterende onderzoeksrapport 'Omlaagschaling van werkzaamheden met replicatie-defectieve AAV- en adenovirale vectoren',¹ en aanvullende literatuurgegevens, concludeert de COGEM dat generieke omlaagschaling van werkzaamheden met op AdV- en AAV-gebaseerde vectorsystemen mogelijk is. In het onderhavige advies licht de COGEM dit voor adenovirale (AdV) replicatie-deficiënte vectorsystemen nader toe. Op een later moment zal zij een apart advies over AAV uitbrengen.

2. Adenovirus

Adenovirussen behoren tot de familie van de *Adenoviridae* en komen voor bij gewervelde dieren zoals mensen, apen, knaagdieren, runderen, slangen, varkens, vissen en vogels. De familie van de *Adenoviridae* omvat vijf genera (*Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus*, *Mastadenovirus* en *Siadenovirus*) en 74 soorten.^{2,3} Regelmatig worden er nieuwe adenovirussen ontdekt. Het genus *Mastadenovirus* is het omvangrijkst en omvat 45 soorten.²

^a De biologische inperking van virussen kan onder meer worden veroorzaakt doordat het virale genoom niet kan repliceren (replicatie-deficiënt), of doordat er geen assemblage van het virusdeeltje kan plaatsvinden, bijvoorbeeld omdat omhullingseiwitten ontbreken (replicatie-incompetent). In beide gevallen is een infectie beperkt tot de eerste infectieronde.

Binnen adenovirussen worden op basis van hun nucleotidensequentie-overeenkomst, hemagglutinatiefiel en gevoeligheid voor neutraliserende antisera diverse typen onderscheiden.⁴ Deze serotypen worden aan de hand van een nummer weergegeven. Binnen sommige soorten zijn serotypen met een verschillend gastheertropisme ondergebracht. Zo omvat *Human mastadenovirus C* humane adenovirussen (bijvoorbeeld humaan adenovirus type 2 en 5 (HAdV-2, HAdV-5)), een runderadenovirus (bovine adenovirus type 9 (BAdV-9)), en een apenadenovirus (simian adenovirus type 13 (SAdV-13)).²

2.1 Pathogeniteitskenmerken adenovirussen

De meeste adenovirussoorten kennen een nauw gastheerbereik dat zich beperkt tot één of enkele zeer verwante diersoorten. Het virus infecteert de luchtwegen, het maagdarmsstelsel en de ogen, en soms de urinewegen en lever.^{2,4,5} Een infectie verloopt doorgaans subklinisch of met lichte symptomen, zonder noodzaak tot medische behandeling, en is meestal zelflimiterend. Bij patiënten met een sterk verzwakt afweersysteem kunnen ontstekingen aan de nieren en longen ontstaan met mogelijk fatale gevolgen.⁴ Na het doormaken van een infectie, kunnen adenovirussen in de vorm van inert DNA episomaal in de cel en latent in weefsels aanwezig blijven.^{1,5}

Besmetting met adenovirus vindt plaats via (in)direct contact, feces en urine, en ten gevolge van aerogene transmissie.^{4,6} Sommige adenovirusinfecties kunnen met behulp van antivirale middelen behandeld worden, maar in veel gevallen zijn deze middelen niet werkzaam.^{2,5,7}

2.2 Pathogeniteitsclassificatie adenovirussen door beoordelende instanties wereldwijd

De COGEM heeft alle adenovirussen waarover zij tot nu toe advies heeft uitgebracht, ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.⁸ Het Belgische Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP) en het Zwitserse 'Federal Office for the Environment' (FOEN) hebben adenovirussen ingedeeld in risicoklasse 2.^{9,10} De Duitse 'Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit' (ZKBS) heeft adenovirussen van paard, schaap, varken, eend, gans, duif, kip, grasparkiet en vis ingedeeld in de laagste risicogroep (groep 1).¹¹ De overige adenovirussen heeft zij ingedeeld in risicogroep 2. De COGEM, FOEN, WIV-ISP en ZKBS nemen pathogeniteit voor mens, dier en plant in ogenschouw.

Voor zover bij de COGEM bekend zijn wereldwijd adenovirussen nooit hoger dan risicogroep 2 ingedeeld. Zij heeft ook geen redenen om aan te nemen dat er adenovirussen zijn die in een hogere risicogroep ingedeeld zouden moeten worden. De inschaling door buitenlandse instanties wordt gebruikt als referentie en achtergrondinformatie bij de overwegingen van de COGEM.

2.3 Structuur en genomische organisatie adenovirussen

Adenovirusdeeltjes bestaan uit een lineair dubbelstrengs DNA molecuul omgeven door een eiwitmantel.^{2,12} De eiwitmantel is opgebouwd uit hexonen, pentonbasen en diverse kleinere eiwitten.^{1,5} In de pentonbasen zijn zogenaamde 'fibers' verankerd. Deze fibers steken uit boven het manteloppervlak en binden aan een receptor op de gastheercel.⁴ De hexonen, pentonbasen en fibers bezitten antigene determinanten, en spelen een belangrijke rol bij de herkenning door het immuunsysteem.⁵ Het hemagglutinatiefiel- en neutralisatieprofiel van een adenovirus wordt hoofdzakelijk door deze manteleiwitten bepaald.

De grootte van het genoom van een adenovirus varieert per soort en omvat tussen de 26 en 49 kilobaseparen (kbp). Het genoom is onderverdeeld in een 'packaging' signaal ψ (psi), een zogenaamde 'vroeg' (Early of E) en 'late' (Late of L) regio, en de 'inverted terminal repeats' (ITR's).⁴

De ITR's bevinden zich aan weerszijden van het genoom en functioneren als 'origin of replication'. De E-regio komt kort na binnenkomst van het virus in de cel tot expressie en bestaat uit verschillende transcriptie-units die elk voor meerdere eiwitten coderen: E1A, E1B, E2A, E2B, E3 en E4.^{1,3,4,5} De E1A eiwitten zijn betrokken bij de inductie van de virusrepletie en expressie van de overige E-genen, en bij het controleren van de celcyclus. De E1B eiwitten remmen de geprogrammeerde celdood (apoptose) van de geïnfecteerde cel. Daarnaast wordt aan het 3' uiteinde van de E1 regio het 'minor capsid' eiwit pIX tot expressie gebracht. Dit eiwit maakt deel uit van de virusmantel, en speelt een rol bij de transductie en het tropisme van het virus.¹³ De E2A en E2B eiwitten zijn noodzakelijk voor repletie van het virale genoom: E2A codeert voor het enkelstrengs (ss)DNA bindende eiwit, en E2B voor het DNA-polymerase en het 'terminal precursor protein'. De E3 eiwitten blokkeren de ontstekingsreactie tegen het virus, onder meer door de functie van 'natural killer' (NK-) cellen, cytotoxische T-lymfocyten en 'tumor necrosis factor' (TNF) tegen te werken. De E4 regio codeert voor eiwitten die betrokken zijn bij het controleren van de celcyclus en bij de expressie van de L-regio.^{3,4,5} De L-regio bevat genen die coderen voor structurele eiwitten die betrokken zijn bij de opbouw van het virusdeeltje.^{3,4} Het 'packaging' signaal ψ is betrokken bij het inpakken van het virale genoom in het virusdeeltje.³ Repletie en assemblage van het virus vinden plaats in de celkern van de gastheercel.⁵

2.4 Adenovirale vectoren

Biomedisch onderzoek aan adenovirussen betreft onder meer de ontwikkeling van virale vectoren, bijvoorbeeld ten behoeve van vaccinontwikkeling of genterapie.⁵ Daartoe worden bepaalde delen uit het adenovirale genoom verwijderd, of worden er op de plek van een deletie transgenen geïntroduceerd met als doel specifieke eiwitten tot expressie te brengen. Ook worden er vectoren ontwikkeld die uit verschillende serotypen van - al dan niet - verschillende adenovirussoorten zijn samengesteld ('hybride vectoren'). Hiertoe worden bijvoorbeeld door uitwisseling delen van fibers of hexonen van een ander adenovirus in de vector-backbone geïntroduceerd (zogenaamde 'hexon/fiber swabs').^{14,15}

3. Adenovirale repletie-deficiënte vectorproductiesystemen

AdV repletie-deficiënte vectorproductiesystemen bestaan uit de combinatie van een adenovirus waarvan één of meerdere transcriptie-units binnen de E regio zijn verwijderd, en een productiecellijn die deze deleties en de daarvoor coderende ontbrekende virale eigenschappen *in trans* complementeert. De deleties in het virus zijn zodanig dat de geproduceerde vector repletie-deficiënt is (niet meer in staat om zijn genoom te repliceren). Er worden drie verschillende AdV repletie-deficiënte productiesystemen onderscheiden: eerste type, tweede type en helper afhankelijke ('helper dependent', HD) productiesystemen.^{1,5} De systemen worden hieronder kort beschreven. Een schematische weergave is terug te vinden in Alba *et al.* (2005)¹⁶ en het onderzoeksrapport van Ameco (Figuur 7, blz. 35)¹.

3.1 Eerste type AdV productiesystemen

Bij de eerste generatie replicatie-deficiënte AdV vectoren bevindt er zich een deletie in de E1-regio ($\Delta E1$ -AdV). Ter plekke kan een expressiecassette met het transgen van interesse worden ingebracht. De E1-regio is onder meer betrokken bij de inductie van de virale replicatie en de expressie van de overige E-genen.

Voor de productie van eerste generatie vectordeeltjes zijn diverse productiecellijnen ontwikkeld. Deze cellijnen verschillen ten aanzien van de sequenties van de ingebrachte E1 regio, de promoter en het poly A-signaal. Bij sommige productiesystemen zijn het E1A en E1B gen op verschillende locaties in het genoom van de cellijn ingebracht. De meest gebruikte productiecellijnen zijn HEK293, 911 en PER.C6.¹ Een overzicht van E1 complementerende productiecellijnen wordt gegeven in Kovesdi *et al.*¹⁷

Sommige eerste type productiesystemen zijn zodanig aangepast dat er, door het ontbreken van sequentiehomologie in de E1 sequenties van zowel het vectordeeltje als de productiecellijn, geen homologe recombinatie kan optreden.^{1,17} Hierdoor is tijdens de productie de kans op het ontstaan van replicatie-competent adenovirus (RCA), en daardoor de kans op 'verontreiniging' van de vectorbatch, geminimaliseerd. Dit geldt bijvoorbeeld voor de op de PER.C6 cellijn gebaseerde productiesystemen.

Om de kloneringscapaciteit van een eerste generatie AdV vector verder te verhogen, kan aanvullend (een gedeelte van) de E3 regio worden verwijderd ($\Delta E3$). De functie van de E3 regio (blokkade van de ontstekingsreactie tegen het virus) hoeft niet door de productiecellijn te worden gecompenseerd, omdat de E3 genen niet voor eiwitten coderen die voor vectorproductie noodzakelijk zijn.^{1,3,5}

3.2 Tweede type AdV productiesystemen

Bij tweede generatie replicatie-deficiënte AdV vectoren bevinden er zich naast een deletie in de E1 regio (en eventueel de E3 regio), ook deleties in de E2A, E2B en/of E4 regio's ($\Delta E2A$, $\Delta E2B$, $\Delta E4$), waardoor er geen replicatie van het virale genoom en geen expressie van de 'late' genen plaatsvindt.^{1,5} Hierdoor wordt de capaciteit ten behoeve van het kloneren van transgenen vergroot.

Productiecellijnen van tweede type productiesystemen complementeren naast de E1- ook de E2A-, E2B- en E4- functies. Deze cellijnen zijn afgeleid van de eerste type productiecellijnen. In het door Ameco *et al.* opgestelde onderzoeksrapport en in Kovesdi *et al.* wordt hier een overzicht van gegeven (resp. Tabel 3 en Tabel 2).^{1,17}

3.3 HD ('helper dependent') AdV productiesystemen

HD AdV vectoren worden ook wel 'high-capacity', 'guttled' of 'gutless' vectoren genoemd. Deze vectoren bevatten alleen de ITR's en het 'packaging' signaal ψ van het adenovirus.^{1,5} De rest van het genoom bestaat uit de expressiecassettes met de transgen(en) van interesse. HD vectoren hebben daardoor een hoge kloneringscapaciteit. Eventueel wordt het genoom aangevuld met niet-coderend 'stuffer' DNA. Het vectorgenoom moet namelijk voldoen aan een bepaalde minimale en maximale lengte, ten einde in de virusmantel ingepakt te kunnen worden.^{1,18,19}

In HD productiesystemen moeten de functies van alle adenovirale genen door de productiecellijn worden gecompenseerd opdat er vectordeeltjes gegenereerd kunnen worden.^{1,16,20} Een aantal

adenovirale genproducten leiden bij constitutieve expressie echter tot cytotoxische effecten.^{1,16,21} Daarom worden bij HD productiesystemen de adenovirale genen door middel van co-infectie met een complementerende 'helpervector' tot expressie gebracht. Als helpervector kan een $\Delta E1$ -AdV vector worden gebruikt in combinatie met een productiecellijn die de E1 regio van adenovirus tot expressie brengt (eerste type AdV productiesysteem).

Om te voorkomen dat het $\Delta E1$ -AdV helpergenoom in een vectordeeltje wordt ingepakt en daardoor - naast de beoogde vector - als 'verontreiniging' in de vectorbatch aanwezig is ('helpervectordeeltjes'), zijn HD productiesystemen verder aangepast door 'site-specific' recombinatiesystemen in te bouwen. Hiervoor wordt meestal het Cre-*loxP* systeem gebruikt. Daartoe zijn in de $\Delta E1$ -AdV helpervector *loxP* sites aangebracht. Deze sites zijn de aangrijpingsplaats van het Cre-recombinase. In een productiecellijn die het Cre-recombinase tot expressie brengt, zal, nadat de $\Delta E1$ -AdV helpervector de productiecel heeft geïnfecteerd, het packaging signaal (ψ) van de helpervector door recombinatie van de *loxP* sites worden verwijderd. Hierdoor wordt het inpakken van het helpervectordeeltje voorkomen.^{1,20,22}

Om de kans op het ontstaan van 'verontreiniging' met ingepakt $\Delta E1$ -AdV helpergenoom nog verder te verkleinen, kan de HD vector worden geoptimaliseerd. Dit wordt bewerkstelligd door in de HD vector overlappende sequenties aan weerszijden van ψ te verwijderen, zodat recombinatie tussen de HD vector en de $\Delta\psi$ - $\Delta E1$ -AdV helpervector wordt tegengegaan.^{1,23}

4. Overwegingen

Dit advies betreft replicatie-deficiënte AdV productiesystemen en vectoren waarvan de ingebrachte transgene eigenschap niet codeert voor een schadelijk genproduct. AdV vectoren met een donorsequentie coderend voor een schadelijk genproduct worden buiten beschouwing gelaten, omdat de COGEM een generieke risicobeoordeling van dergelijke recombinanten op voorhand lastig acht.

Replicatie-deficiënte AdV vectoren zijn biologisch ingeperkt omdat zij transcriptie-units binnen de E1-regio missen waardoor zij hun genoom niet kunnen repliceren. Na infectie van een cel, zullen de effecten tot de eerste infectieronde beperkt zijn. Door de deficiëntie kunnen de vectoren zich niet autonoom in een cel vermeerderen, geen productieve infectie bewerkstelligen, en zich niet in het milieu verspreiden. Het milieurisico bij de productie van en toepassingen met replicatie-deficiënte AdV vectoren, wordt daardoor bepaald door de kans dat er onbedoeld replicatie-competent adenovirus wordt gevormd dat zich in het milieu verspreidt. Aangezien tijdens de productie van een vectorbatch andere risico-aspecten een rol spelen dan tijdens het toepassen van een vector, werkt de COGEM deze activiteiten hieronder gescheiden uit.

4.1 Productie van replicatie-deficiënte AdV vectoren

Replicatie-deficiënte AdV vectoren missen één of meerdere transcriptie-units uit de E1-regio ($\Delta E1$ -AdV), en afhankelijk van het productiesysteem daarnaast nog meerdere transcriptie-units uit andere E-regio's ($\Delta E2A$, $\Delta E2B$, $\Delta E3$, $\Delta E4$, HD). Productie en vermeerdering van de vectordeeltjes vinden plaats in speciaal daarvoor ontwikkelde cellijnen, die de ontbrekende eigenschap(en) complementeren. In verschillende studies is aangetoond dat er tijdens de productie van replicatie-deficiënte AdV vectordeeltjes homologe recombinatie kan optreden wanneer de flankerende

sequenties van de E1-regio in de virale vector met de sequentie van de E1-regio in de productiecellijn overlappen. Hierdoor kan er bij sommige productiesystemen RCA ontstaan.^{1,16,24}

4.1.1 Kans op RCA-vorming bij eerste type AdV productiesystemen

Indien er gebruik gemaakt wordt van een eerste type productiesysteem (productie $\Delta E1$ -AdV of $\Delta E1\Delta E3$ -Adv vectoren), kan na recombinatie van de E1 regio RCA gevormd worden. Het RCA zal in het geval van de $\Delta E1$ vector nagenoeg gelijk zijn aan een wildtype adenovirus. In het geval van de $\Delta E1\Delta E3$ vector, zal het gevormde RCA geattenuerd zijn vanwege het ontbreken van de E3 regio (att-RCA).^{1,24} Indien er een transgen in de E3 regio is geïntroduceerd, zal het gevormde att-RCA het transgen bevatten (transgeen att-RCA). De COGEM merkt op dat bij $\Delta E1\Delta E3$ vectoren de vectordeeltjes weliswaar replicatie-competent zijn, maar dat vanwege de attenuering dit *in vivo* niet tot een productieve infectie zal leiden, omdat de deeltjes direct door het immuunsysteem zullen worden opgeruimd. Voor zover bij de COGEM bekend zijn in de natuur ook nog nooit $\Delta E3$ adenovirussen aangetroffen. Dit onderbouwt de stelling dat $\Delta E1\Delta E3$ vectoren zich niet in het milieu kunnen handhaven.

Wanneer er gebruik is gemaakt van vector-backbones samengesteld uit verschillende adenovirussen (bijvoorbeeld hybride vectoren, zie 2.4), zal er bij RCA-vorming een hybride virusdeeltje ontstaan. Omdat alle adenovirussen ingedeeld zijn in pathogeniteitsklasse 2, heeft de COGEM geen redenen om aan te nemen dat dit voor hybride adenovirussen anders zou zijn, en acht zij de pathogeniteit van dit hybride RCA vergelijkbaar met dat van de uitgangsgorganismen.

Bij sommige productiesystemen is er geen homologie tussen de E1 regio's van de vector en cellijn, waardoor er geen homologe recombinatie kan optreden en de kans verwaarloosbaar klein is dat er RCA ontstaat. Gao *et al.* (2000) en Schnieder *et al.* (2000) hebben dit proefondervindelijk voor dergelijke systemen bevestigd.^{1,25,26} Ook is de kans op RCA-vorming verwaarloosbaar klein bij productiesystemen die gebruik maken van de PER.C6 cellijn in combinatie met specifieke vectoren waarbij er geen sequentiehomologie in de sequenties van beide E1-regio's aanwezig is.^{1,27} De COGEM is daarom van oordeel dat de kans op RCA-vorming verwaarloosbaar klein is indien aan de hand van sequentiegegevens is bevestigd dat de gebruikte productiecellijn en de replicatie-deficiënte AdV vector niet over sequentiehomologie in de E1 regio beschikken.

4.1.2 Kans op RCA-vorming bij tweede type AdV productiesystemen

In tweede generatie AdV vectoren zijn, naast de E1-regio, de E2A-, E2B- en/of E4-regio's verwijderd. Voor replicatie van het vectorgenoom zijn echter de transcriptie-units van E1, E2A en E2B noodzakelijk. De COGEM acht bij tweede generatie AdV vectoren de kans verwaarloosbaar klein dat er tijdens de productie RCA gevormd wordt, omdat daar meerdere recombinaties voor nodig zijn. Als er recombinatie optreedt, zullen er nieuwe replicatie-deficiënte vectoren worden gevormd, waarin slechts één van de genoemde regio's geherintroduceerd is.

4.1.3 Kans op RCA-vorming bij HD AdV productiesystemen

Indien gebruik gemaakt is van een HD productiesysteem, zal er vanuit de AdV vector geen RCA kunnen ontstaan door middel van homologe recombinatie, omdat de vector alleen de ITR's en het

'packaging' signaal bevat. De kans op het ontstaan van RCA vanuit de helpervector is echter niet uitgesloten. Wel kan deze door de aanwezigheid van een 'site-specific' recombinatiesysteem (bijvoorbeeld het Cre-*loxP* systeem) gereduceerd worden. Palmer *et al.* (2003) hebben aangetoond dat 10^{13} vectordeeltjes geproduceerd met behulp van een HD productiesysteem voor 0,01-0,02% gecontamineerd zijn met helpervectordeeltjes.^{1,22} Analoog aan eerste type productiesystemen kunnen deze helpervectordeeltjes door middel van homologe recombinatie RCA vormen.

Samenvattend concludeert de COGEM dat:

- tijdens de productie van replicatie-deficiënte AdV vectoren met behulp van eerste type en HD productiesystemen, de kans bestaat dat er door middel van homologe recombinatie RCA wordt gevormd. Zij is daarom van oordeel dat deze productie op ML-II niveau moet worden uitgevoerd.
- wanneer bij eerste type of HD productiesystemen gebruik is gemaakt van een (helper)vector/cellijncombinatie zonder sequentie homologie in de E1-regio, of wanneer gebruik is gemaakt van een tweede type productiesysteem, acht zij de kans op RCA-vorming verwaarloosbaar klein. Zij is van oordeel dat het milieurisico verwaarloosbaar klein is als in dat geval de productie plaatsvindt op ML-I inperkingsniveau.

4.2 Werkzaamheden met replicatie-deficiënte AdV vectoren

Om experimenten met adenovirale vectorbatches voor inschaling op inperkingsniveau I in aanmerking te kunnen laten komen, spelen drie aspecten een rol. Ten eerste mag er geen RCA in de vectorbatch aanwezig zijn (zie 4.1). Ten tweede zal de kans op RCA-vorming verwaarloosbaar klein moeten zijn. Ten derde acht de COGEM het ongewenst dat mens en dier onbedoeld worden blootgesteld aan hoge concentraties replicatie-deficiënte adenovirale vectordeeltjes. Deze deeltjes zijn weliswaar biologisch ingeperkt, kunnen zich niet in het milieu verspreiden, en vormen geen milieurisico, maar wel zijn zij infectieus en in staat laboratoriummedewerkers of - tijdens *in vivo* experimenten –niet bij het experiment betrokken dieren te infecteren. Voor de veiligheid van de medewerker is in dit geval de ARBO-regelgeving van toepassing. Voor zover bij de COGEM bekend, bestaat er voor dieren echter geen vergelijkbare regelgeving. Zij beschouwt daarom ten behoeve van de veiligheid van niet bij het experiment betrokken dieren de ggo-regelgeving het meest toereikend, en is van oordeel dat er geen hoge concentraties replicatie-deficiënte adenovirale vectordeeltjes vrij mogen komen indien men *in vivo* experimenten voor omlaagschaling naar D-I niveau in aanmerking wil laten komen.

Met betrekking tot het eerste aspect merkt de COGEM op dat in vectorbatches, die met behulp van eerste type en HD productiesystemen zijn geproduceerd en waarbij de E1-regio's van de virale vector en productieceldlijn vanwege overlappende sequenties gelijkenis vertonen, RCA aanwezig kan zijn. Zij is daarom van oordeel dat deze batches gecontroleerd moeten worden op de afwezigheid van RCA, alvorens toepassingen met deze vectoren voor omlaagschaling in aanmerking komen. Hier kan bijvoorbeeld een adequate bioassay of kwantitatieve (q-)PCR voor gebruikt worden. Een q-PCR zal het aantal aanwezige genoomkopieën aantonen, maar geen maat zijn voor de hoeveelheid infectieus virus. Daardoor zal de gevonden waarde een overschatting zijn van de werkelijke RCA titer. De

COGEM is van oordeel dat een adequate PCR voldoet, wanneer de detectielimiet van < 1 RCA genoomkopieën per 5×10^7 replicatie-deficiënte infectieuze vectordeeltjes bedraagt.²⁸

Indien er gebruik gemaakt is van eerste type of HD productiesystemen zonder sequentiehomologie in de E1-regio, of indien er gebruik is gemaakt van tweede type productiesystemen, acht de COGEM het niet noodzakelijk dat vectorbatches vooraf gecontroleerd worden op de afwezigheid van RCA.

Met betrekking tot de andere twee aspecten, namelijk geen RCA-vorming tijdens experimenten en de ongewenste blootstelling van niet bij het experiment betrokken proefdieren aan vectordeeltjes, is het van belang in kaart te brengen wanneer dit zou kunnen optreden. De COGEM maakt hiervoor onderscheid tussen *in vitro* en *in vivo* experimenten.

4.2.1 Kans op RCA-vorming tijdens *in vitro* experimenten

Tijdens transductie-experimenten zullen de effecten op cellen zich tot de eerste infectieronde beperken omdat het vectordeeltje replicatie-deficiënt is. Het vectorgenoom zal kortdurend in de vorm van inert DNA episomaal in de cel aanwezig blijven.³³ In theorie zou er, als cellen met adenovirus gecontamineerd zijn (bijvoorbeeld bij het gebruik van primaire zoogdiercellen), bij co-infectie met een vectordeeltje na complementatie door middel van homologe recombinatie RCA kunnen ontstaan. De COGEM merkt op dat contaminatie van cellen met adenovirus snel opgemerkt zal worden door het (opvallende) optreden van virus-geïnduceerde celdood. Daarnaast zijn latente of persisterende adenovirusinfecties in cultures van permissieve gastheercellen zeldzaam en is, voor zover bij de COGEM bekend, niet aangetoond dat latent geïnfekteerde cellijnen na infectie met replicatie-deficiënte vectoren tot RCA kunnen leiden.

Ook zouden cellen tijdens de uitvoering van een experiment van buitenaf met wildtype adenovirus gecontamineerd kunnen worden, bijvoorbeeld door onbedoelde 'insleep'. De COGEM acht de kans op deze vorm van contaminatie zeer klein omdat - ook op ML-I inperkingsniveau - open handelingen bij cel- en weefselkweekexperimenten in een veiligheidskabinet plaatsvinden, ten einde microbiële contaminatie van cel(lijn)en te voorkomen. Daarnaast zullen in de werkruimte routinematig veilige microbiologische technieken worden toegepast. Zij acht daarom de kans verwaarloosbaar klein dat cellen door insleep met wildtype adenovirus gecontamineerd worden. Bovendien is de COGEM van oordeel dat eventueel gevormd RCA ten opzichte van ingesleept wildtype adenovirus geen verhoogd risico met zich meebrengt.

Bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat:

- de kans verwaarloosbaar klein is dat er, indien een vectorbatch in aanvang vrij is van RCA, tijdens *in vitro* toepassingen RCA kan ontstaan;
- replicatie-deficiënte AdV vectorbatches, mits vrij van RCA, op ML-I niveau gehanteerd kunnen worden;
- een vectorbatch vrij van RCA is, als deze met behulp van een tweede type productiesysteem is geproduceerd, of als er gebruik gemaakt is van een eerste type of HD productiesysteem zonder sequentiehomologie in de E1-regio's;

- indien van een ander productiesysteem gebruik gemaakt is, de vectorbatch eerst met een gevoelige en gevalideerde RCA assay getest dient te zijn. De assay voldoet wanneer deze een detectielimiet heeft van < 1 RCA genoomkopieën per 5×10^7 replicatie-deficiënte infectieuze vectordeeltjes.

4.2.2 Kans op RCA-vorming tijdens *in vivo* experimenten

Naast laboratoriumexperimenten wordt de functionaliteit van vectoren ook in proefdieren onderzocht. Als een aanvrager het inperkingsniveau van deze experimenten voor DM-I inschaling in aanmerking wil laten komen, zal de vectorbatch vrij moeten zijn van RCA. Daarnaast is het van belang dat de kans op het ontstaan van RCA in het proefdier verwaarloosbaar klein is.

Indien een proefdier (semi-)permissief is voor een toegediende vector, maar deze vector niet gebaseerd is op een voor de mens permissief adenovirus, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de vector bij de mens tot een productieve infectie zal leiden. Voor zover bekend, kunnen alleen humane en apen-adenovirussen bij de mens tot een productieve infectie kunnen leiden. Indien een proefdier (semi-)permissief is voor de toe te dienen vector, en deze vector kan wel bij de mens tot een productieve infectie leiden (aan niet-humane primaten, katoenratten of Syrische hamsters wordt bijvoorbeeld een op HAdV gebaseerde replicatie-deficiënte vector toegediend),^{29,30} kan er vanuit het vectordeeltje RCA ontstaan wanneer het dier een adenovirusinfectie doormaakt, eenzelfde cel door vector en virus wordt geïnfecteerd, en er na complementatie homologe recombinatie tussen het genoom van het vectordeeltje en adenovirus optreedt. De kans op co-infectie wordt verhoogd wanneer hoge doses lokaal in een te onderzoeken weefsel of orgaan worden toegediend. Om deze *in vivo* experimenten voor DM-I inschaling in aanmerking te kunnen laten komen, acht de COGEM het daarom noodzakelijk dat de proefdieren voorafgaand aan het experiment geen tekenen van een acute actieve adenovirusinfectie vertonen.

Overigens merkt de COGEM daarbij op dat zij de kans verwaarloosbaar klein acht dat muizen, ratten, hamsters, cavia's en konijnen drager zijn van adenovirus omdat proefdiercentra de aanbevelingen van de 'Federation of European Laboratory Animal Science Associations' (FELASA) volgen.³¹ Dit orgaan stelt dat proefdieren vrij moeten zijn van bepaalde infectieuze agentia. Om hiervoor zorg te dragen worden daarom in proefdiercentra muizen, ratten, hamsters, cavia's en konijnen, regelmatig gescreend op dragerschap van adenovirussen.³²

Indien een proefdier niet-permissief is voor de toe te dienen vector, kan het dier weliswaar adenovirus bij zich dragen, maar zal de sequentiehomologie met die vector zeer beperkt zijn. Dit geldt bijvoorbeeld wanneer een muis, konijn, hond, varken of schaap een op HAdV gebaseerde replicatie-deficiënte vector krijgt toegediend. De COGEM acht daarom voor dergelijke *in vivo* toepassingen de kans op homologe recombinatie verwaarloosbaar. Zij is van oordeel dat in dit geval de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn als de experimenten op DM-I niveau worden uitgevoerd.

Samenvattend is de COGEM van oordeel dat, indien een proefdier niet-permissief is voor de toe te dienen vector, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein als de experimenten op DM-I niveau worden uitgevoerd. Indien een proefdier (semi-)permissief is voor een toe te dienen vector, en deze vector kan bij de mens tot een productieve infectie leiden, is de COGEM van oordeel dat het

proefdier voorafgaand aan het experiment geen tekenen van een acute actieve adenovirusinfectie mag vertonen. Indien aan deze voorwaarde wordt voldaan, acht zij de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein als het experiment op DM-I niveau wordt uitgevoerd.

4.2.3 Kans op het vrijkomen van replicatie-deficiënte vectordeeltjes tijdens *in vivo* experimenten

Indien een onderzoeker *in vivo* experimenten in aanmerking wil laten komen voor omlaagschaling naar D-I niveau, acht de COGEM het ongewenst als het dier replicatie-deficiënte AdV vectordeeltjes uitscheidt. Deze vormen geen milieurisico, maar zijn wel infectieus en kunnen bijvoorbeeld via aërosolen of (in)direct contact naar andere dieren overgedragen worden. Op basis van de bevindingen in het onderzoeksrapport en voor zover bij de COGEM bekend, scheiden proefdieren een week na toediening geen infectieuze replicatie-deficiënte AdV vectordeeltjes meer uit.¹ Zij is daarom van oordeel dat na een week overplaatsing van proefdieren naar D-I inperkingsniveau gerechtvaardigd is, en acht het daarbij niet noodzakelijk dat er een kwantitatieve PCR wordt uitgevoerd die de afwezigheid van vectorgenomen in een lichaamssecret bevestigt.

5. Advies

Op basis van bovenstaande overwegingen komt de COGEM tot het volgende:

- Zij adviseert de productie van eerste generatie en HD replicatie-deficiënte AdV vectoren op ML-II niveau uit te voeren omdat door middel van homologe recombinatie RCA kan worden gevormd. Indien met behulp van een gevoelige en gevalideerde methode is aangetoond dat er geen RCA in de vectorbatch aanwezig is (detectielimiet < 1 RCA genoomkopieën per 5×10^7 replicatie-deficiënte infectieuze vectordeeltjes), acht zij de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein als *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met deze batches op inperkingsniveau I worden uitgevoerd.
- De productie van tweede generatie vectoren, of van eerste generatie en HD replicatie-deficiënte AdV vectoren zonder sequentiehomologie in de E1-regio's van vector en productieceldlijn (vastgesteld door middel van sequentiegegevens), adviseert de COGEM uit te voeren op ML-I inperkingsniveau. Zij acht bij deze productiesystemen de kans verwaarloosbaar klein dat door middel van homologe recombinatie RCA wordt gevormd. Tevens acht zij de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein, als *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met deze vectorbatches op inperkingsniveau I worden uitgevoerd. Zij is van oordeel dat de batches voorafgaand aan de experimenten niet op de afwezigheid van RCA hoeven te worden gecontroleerd.
- Indien een proefdier niet-permissief is voor een toe te dienen replicatie-deficiënte AdV vector, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein als de experimenten op DM-I niveau worden uitgevoerd. Indien een proefdier (semi-)permissief is voor een toe te passen replicatie-deficiënte AdV vector, acht zij het noodzakelijk dat het dier voorafgaand aan het experiment geen verschijnselen van een acute adenovirusinfectie vertoont, ten einde tijdens het experiment complementatie, homologe

recombinatie en RCA-vorming te voorkomen. Indien aan deze voorwaarde wordt voldaan, acht zij de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein als het experiment op DM-I niveau wordt uitgevoerd.

- De COGEM acht het bij *in vivo* experimenten noodzakelijk dat de dieren minimaal een week op DM-I inperkingsniveau verblijven, alvorens deze voor omlaagschaling naar D-I inperkingsniveau in aanmerking komen. Na deze week acht zij de kans verwaarloosbaar klein dat de dieren nog vectordeeltjes uitscheiden, en is zij van oordeel dat de veiligheid voor mens en dier gewaarborgd is als de dieren op D-I inperkingsniveau worden gehuisvest.

6. Signalering ARBO-aspecten

De COGEM signaleert dat er tijdens de productie van replicatie-deficiënte AdV vectordeeltjes grote hoeveelheden infectieuze deeltjes worden gegenereerd die weliswaar geen milieurisico vormen, maar wel in staat zijn medewerkers te infecteren. Als een medewerker onbedoeld aan vectordeeltjes wordt blootgesteld, brengt dit mogelijk een nadelig effect met zich mee. Na infectie zijn de deeltjes kortdurend episomaal als inert DNA in de cel aanwezig en kan er lage expressie van de adenovirale genen optreden.³³ Hierdoor kan er door de getransduceerde cellen een immuunreactie worden opgewekt met mogelijk een schadelijke werking voor de gastheer. Dit is een ARBO-aspect en vraagt om het treffen van veiligheidsmaatregelen.

Aanvullend merkt de COGEM op dat, indien een medewerker een (sub)klinische adenovirusinfectie doormaakt en tijdens werkzaamheden per ongeluk onbedoeld besmet wordt met een replicatie-deficiënt (helper)vectordeeltje van de 'eerste generatie', in theorie niet volledig uitgesloten kan worden dat er ten gevolge van complementatie en homologe recombinatie met het wildtype adenovirus, RCA gevormd kan worden. In de literatuur is *in vitro* complementatie van $\Delta E1$ -vectoren met wildtype adenovirus beschreven, zowel tussen verschillende serotypen binnen eenzelfde adenovirussoort (intraspecies), als tussen verschillende adenovirussoorten (interspecies).³⁴ Daarnaast komt intraspecies recombinatie van nature bij adenovirussen voor. Hierbij kunnen onder meer hexonen, pentonbasen en fiberfragmenten (shaft/knob regio) uitgewisseld worden.^{35,36,37,38} Ook interspecies recombinatie komt bij adenovirussen voor.^{38,39} Hoewel bij homologe recombinatie een (hybride) RCA gevormd zou kunnen worden, is de COGEM van oordeel dat het gevormde RCA niet pathogener is dan het wildtype adenovirus waarmee de medewerker al geïnfecteerd was. Zij beschouwt een dergelijk incident niet als een milieurisico.

Referenties

1. Bergmans JEN *et al.* (2017). Omlaagschaling van werkzaamheden met replicatie-defectieve AAV- en adenovirale vectoren. COGEM rapport CGM 2017-4
2. International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 16 maart 2018)
3. Berk AJ (2013). *Adenoviridae*. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia

4. Harrach B *et al.* (2012). Family *Adenoviridae*. In: Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
5. Wold WSM & Ison MG (2013). Adenoviruses. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
6. Lion T (2014). Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. Clin. Microbiol. Rev. 27: 441-462
7. Hoeben RG & Uil TG (2013). Adenovirus DNA replication. Cold Spring Harb. Perspect. Biol 5: a013003
8. COGEM (2017). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humane- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/170522-03
9. Wetenschappelijk Instituut voor de Volksgezondheid/ Institut Scientifique de Santé Public (WIV-ISP) (2008). List of viruses and unconventional agents presenting at the wild state a biological risk for immunocompetent humans and/or animals and corresponding maximum biological risk. <https://www.biosafety.be/node/286> (bezoekt: 16 maart 2018)
10. Federal Office for the Environment FOEN (2013). Classification of Organisms. Part 2: Viruses. <https://www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html> (bezoekt: 16 maart 2018)
11. Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (2013). https://www.bvl.bund.de/DE/06_Gentechnik/03_Antragsteller/06_Institutionen_fuer_biologische_Sicherheit/01_ZKBS/03_Organismenliste/gentechnik_zkbs_organismenliste_node.html (bezoekt: 6 februari 2018)
12. McConnell MJ & Imperiale MJ (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. Hum. Gene Ther. 15: 1022-1033
13. De Vrij J *et al.* (2011). Enhanced transduction of CAR-negative cells by protein IX-gene deleted adenovirus 5 vectors. Virology 410: 192–200
14. COGEM (2012). Experimenten met onbekende adenovirussen uit mensapen. COGEM advies CGM/121210-01
15. COGEM (2016). Classificatie van mensen-, apen- en slangenadenovirussen, en inschaling werkzaamheden met hiervan afgeleide gg-adenovirale vectoren. COGEM advies CGM/161124-02
16. Alba R *et al.* (2005). Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. Gene Ther. Conference paper: S18-S27
17. Kovesdi I & Hedley SJ *et al.* (2010). Adenoviral producer cells. Viruses 2: 1681-1703
18. Parks RJ & Graham FL (1997). A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging. J. Virol. 71: 3293-3298
19. Bett AJ *et al.* (1993). Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. J. Virol. 67: 5911-5921
20. Cots D *et al.* (2013). Helper dependent adenovirus vectors: progress and future prospects. Curr. Gene Ther. 13: 370-381

21. Schiedner G *et al.* (1998). Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved *in vivo* gene expression and decreased toxicity. *Nature Genet.*: 18: 180-183
22. Palmer D & Ng P (2003). Improved system for helper-dependent adenoviral vector production. *Molec. Ther.* 8: 846-852
23. Ng P *et al.* (2002). Cre levels limit packaging signal excision efficiency in the Cre/loxP helper-dependent adenoviral vector system. *J. Virol.* 76: 4181–4189
24. Fallaux FJ *et al.* (1999). Who is afraid of replication-competent adenoviruses? *Gene Ther.* 6: 709-712
25. Gao GP *et al.* (2000). A cell line for high-yield production of E1-deleted adenovirus vectors without the emergence of replication-competent virus. *Hum. Gene Ther.* 11: 213-219
26. Schiedner G *et al.* (2000). Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Hum. Gene Ther.* 11: 2105-2116
27. Fallaux FJ *et al.* (1998). New helper cells and matched early region-1 deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* 9: 1909–1917
28. Pietersen AM *et al.* (1999) Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the apoptin gene. *Gene Ther.* 6: 882-892
29. Toth K *et al.* (2005). Cotton rat tumor model for the evaluation of oncolytic adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* 16: 139-146
30. Ying B *et al.* (2009). INGN 007, an oncolytic adenovirus vector, replicates in Syrian hamsters but not mice: comparison of biodistribution studies. *Cancer Gene Ther.* 16: 625-637
31. FELASA (2012). FELASA guidelines and recommendations journal of the American association for laboratory animal science. 51: 311-321
32. FELASA (2014). FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals* 48: 178-192
33. Nelson JE & Kay MA (1997). Persistence of recombinant adenovirus *in vivo* is not dependent on vector DNA replication. *J. Virol.* 71: 8902-8907
34. Rademaker HJ *et al.* (2002). Efficient mobilization of E1-deleted adenovirus type 5 vectors by wild-type adenoviruses of other serotypes. *J. Gen. Virol.* 83: 1311-1314
35. Darr S *et al.* (2009). Phylogeny and primary structure analysis of fiber shafts of all human adenovirus types for rational design of adenoviral gene-therapy vectors. *J. Gen. Virol.* 90: 2849-2854
36. Hage E *et al.* (2017). Three novel, multiple recombinant types of species of human mastadenovirus D (HAdV-D 73, 74 & 75) isolated from diarrhoeal faeces of immunocompromised patients. *J. Gen. Virol.* 98: 3037-3045
37. Lukashev AN *et al.* (2008). Evidence of frequent recombination among human adenoviruses. *J. Gen. Virol.* 89: 380-388
38. Madisch I *et al.* (2005). Phylogenetic analysis of the main neutralization and hemagglutination determinants of all human adenovirus prototypes as a basis for molecular classification and taxonomy. *J. Virol.* 79: 15265-15276
39. Dehgan S *et al.* (2013). Computational analysis of four human adenovirus type 4 genomes reveals molecular evolution through two interspecies recombination events. *Virology* 443: 197-207