

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

**DATUM** 21 maart 2018  
**KENMERK** CGM/180321-01  
**ONDERWERP** Advies pathogeniteitsclassificatie AAVs

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier IG 18-028\_2.8-000 getiteld 'Productie van en handelingen met recombinant adeno geassocieerd virus (AAV-)vectoren met gemodificeerde capsiden en capsiden van wild type AAV serotypen afwezig op bijlage 4', ingediend door Arthrogen B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van vijf Adeno-associated virussen (AAVs): AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh10 en AAVpo1.

Er zijn tegenwoordig meer dan 100 AAVs geïsoleerd uit verschillende gastheren. AAVs kunnen gewervelde dieren infecteren, waaronder de mens (95% van de mensen is ooit blootgesteld aan een AAV). Voor hun levenscyclus zijn AAVs afhankelijk van een helpervirus. Bij afwezigheid van een helpervirus blijft het genoom van de AAVs latent aanwezig in de celkern. Tot op heden zijn er in de literatuur geen meldingen over ziekteverschijnselen veroorzaakt door infectie met AAVs. Ook over AAV10, 11, 12, AAVrh10 en AAVpo1 zijn in de literatuur geen meldingen van pathogeniteit. AAV vectoren worden regelmatig toegepast in klinische studies.

Gezien de bovenstaande informatie adviseert de COGEM om AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh10 en AAVpo1 als apathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Gebaseerd op de alomtegenwoordigheid van AAVs en het gebrek aan aanwijzingen voor pathogeniteit, adviseert de COGEM om alle AAVs vallend onder de soorten *Adeno-associated dependoparvovirus A* en *Adeno-associated dependoparvovirus B* in te delen in pathogeniteitsklasse 1.



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

# ***Adeno-associated dependoparvovirus A en Adeno-associated dependoparvovirus B ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1***

## **COGEM advies CGM/180321-01**

### **1. Inleiding**

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag van Arthrogen B.V. (IG 18-028) is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van vijf Adeno-associated virussen (AAVs), namelijk AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh10 en AAVpo1.

### **2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling ggo**

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in oenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (Regeling ggo)<sup>1</sup> 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. Taxonomie

Adeno-associated virussen (AAVs) behoren tot de familie *Parvoviridae* en zijn ondergebracht onder verschillende soorten binnen het genus *Dependoparvovirus*.<sup>2</sup> Tot op heden zijn er meer dan 100 verschillende AAVs geïsoleerd uit verschillende gastheren, zoals mensen, primaten, geiten, vleermuizen, zeeleeuwen, vogels en koeien. Volgens de huidige taxonomische indeling (ICTV 2017) zijn 23 AAVs ondergebracht binnen het genus *Dependoparvovirus*.<sup>3</sup> De overige AAVs zijn nog niet taxonomisch ingedeeld. *Adeno-associated dependoparvovirus A* is de typesoort van het genus, en omvat AAV1-4, AAV6-13, en AAV-S17. *Adeno-associated dependoparvovirus B* omvat AAV5, Bovine adeno-associated virus (BAAV) en Caprine adeno-associated virus (CapAAV). Naast deze twee soorten, kent het genus ook de soorten *Anseriform dependoparvovirus 1* (omvat Duck parvovirus, DPV; Goose parvovirus, GPV; en Goose parvovirus-PT, GPV2), *Avian dependoparvovirus 1* (omvat Avian adeno-associated virus, AAV), *Chiropteran dependoparvovirus 1* (omvat Bat adeno-associated virus, BtAAV), *Pinniped dependoparvovirus 1* (omvat California sea lion adeno-associated virus, CslAAV), en *Squamate dependoparvovirus 1* (omvat Snake adeno-associated virus, SAAV).

### 4. Adeno-associated virussen

Voor *in vivo* replicatie hebben AAVs co-infectie met een helpervirus nodig, meestal een adenovirus of in sommige gevallen een herpesvirus.<sup>4,5</sup> Door deze eigenschap onderscheiden AAVs zich van andere virussen binnen de *Parvoviridae* familie.<sup>6</sup> Bij afwezigheid van een helpervirus zal het virale genoom zich niet repliceren, en ontstaat er een persistente ‘infectie’ waarbij het AAV genoom latent intra- of extrachromosomaal in de celkern aanwezig blijft.<sup>5,7</sup> Integratie van het AAV genoom is locatie-specifiek, en vindt meestal plaats in de lange (q) arm van chromosoom 19.<sup>8</sup> De ‘duck’ en ‘goose’ parvovirussen (behorende tot de soort *Anseriform dependoparvovirus 1*) zijn niet afhankelijk van een helpervirus voor replicatie en zijn daarmee de enige uitzonderingen binnen het genus *Dependoparvovirus*.<sup>4</sup>

#### 4.1 Genoom AAVs

AAVs bevatten een enkelstrengs DNA genoom dat codeert voor twee genen, *rep* en *cap*. Deze 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. Het DNA bevat drie promotoren voor de transcriptie van het mRNA, waarbij door klieving van een deel van het mRNA verschillende eiwitten verkregen kunnen worden.<sup>4</sup> Het *rep* gen codeert voor vier replicase eiwitten die een rol spelen bij de virusreplicatie, de expressie van de structurele eiwitten en de integratie van het virusgenoom in het genoom van de gastheer. Het *cap* gen codeert voor de drie manteleiwitten. Hypervariabele regio’s in de manteleiwitten beïnvloeden de weefsel-specificiteit van AAVs.<sup>9</sup>

## **4.2 Infectie en pathogeniteit**

AAVs kunnen bijna alle gewervelde dieren infecteren, onder meer de mens, en hebben een nauw gastheerbereik.<sup>4</sup> Virale sequenties worden in veel verschillende weefseltypen aangetroffen.<sup>5,10</sup> De AAVs vertonen verschillen in onder andere gastheerspecificiteit en weefseltropisme. De meeste AAVs zijn op basis van DNA sequenties met behulp van PCR geïsoleerd uit cellen/weefsels van verschillende diersoorten (inclusief de mens).<sup>11</sup> Alleen de eerste zes AAVs (AAV1-6) zijn daadwerkelijk als virus geïsoleerd uit apen en/of mensen.

Infecties met AAVs komen wereldwijd en frequent voor, ongeveer 95% van de humane populatie is ooit blootgesteld aan AAV2.<sup>7</sup> Het virus wordt waarschijnlijk overgedragen via de respiratoire of gastro-intestinale route.<sup>5</sup> AAV1 kan via de placenta overgedragen worden aan de foetus.<sup>4</sup> Tot op heden zijn er in de literatuur geen meldingen over ziekteverschijnselen veroorzaakt door AAV.<sup>12,13</sup>

Recombinante AAV vectoren worden in klinische studies toegepast als therapie tegen verschillende aandoeningen. Bij deze vectoren wordt de transgene sequentie tussen de ITRs geplaatst, en worden de *rep* en *cap* genen *in trans* aangeboden.<sup>7</sup> AAV2 is de eerste AAV die als vector toegepast is voor genterapie. Inmiddels zijn AAV2, AAV5, AAV8 en AAV9 vectoren in meer dan 160 klinische trials bij mensen toegepast.<sup>14</sup>

## **4.3 AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh10 en AAVpo1**

AAV10-12 zijn door de ICTV binnen de soort *Adeno-associated dependoparvovirus A* ondergebracht. AAV10 en AAV11 zijn in 2004 geïsoleerd uit weefsel van Java apen op basis van DNA sequenties.<sup>15</sup> De aminozuursequenties van de AAV10 en AAV11 manteleiwitten komen overeen met die van AAV8 en AAV4. Het tropisme van AAV10 en AAV11 is breder dan dat van AAV2.<sup>15,16</sup> AAV12 is in 2008 geïsoleerd uit een simian adenovirus stock.<sup>17</sup> De genoomsequentie van AAV12 komt het meest overeen met AAV11 (83%) en AAV4 (81%), en het minst met AAV5 (63%).<sup>17</sup>

AAVrh10 en AAVpo1 zijn taxonomisch nog niet ingedeeld door de ICTV. AAVrh10 is één van de 37 klonen die in 2003 geïsoleerd zijn uit weefsel van rhesusapen met behulp van PCR.<sup>9</sup> AAVrh10 heeft (evenals AAV9) de eigenschap dat het de bloed-brein barrière kan passeren. Hierdoor kan AAVrh10, naast vele andere soorten weefsels, ook cellen in het centrale zenuwstelsel (inclusief het brein) transduceren.<sup>18</sup> Omdat deze AAVs afkomstig zijn van rhesusapen, werd aangenomen dat de immuunrespons tegen AAVrh10 minder zou zijn dan tegen AAV9 (afkomstig van humaan weefsel). Echter, gebleken is dat 59% van de mensen antistoffen bezit tegen AAVrh10.<sup>19</sup> Hieruit kan worden opgemaakt dat antilichamen tegen humane AAVs ook effectief kunnen zijn tegen AAVs van rhesusapen. AAVpo1 is in 2009 geïsoleerd uit verschillende weefsels afkomstig van varkens.<sup>20</sup> Het Cap eiwit van AAVpo1 toonde een overeenkomst van 87,1% in aminozuursequentie en 84,7% nucleotidesequentie met AAV5.<sup>20</sup>

## **5. Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over AAV10-12, AAVrh10 of AAVpo1. AAV1-9 heeft zij ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.<sup>21,22</sup>

## 6. Classificaties door andere beoordelende instanties

De Duitse 'Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin' (BAUA) die pathogeniteit voor de mens beoordeelt, heeft AAV1, 4 en 6-11 ingedeeld in risicogroep 2, en AAV2, 3 en 5 als apathogeen ingedeeld in de laagste risicogroep (groep 1).<sup>23</sup> Ook zijn Canine, Equine, Avian, Bovine en Ovine AAV ingedeeld in risicogroep 1. De Duitse 'Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit' (ZKBS), die pathogeniteit voor mens, dier en plant in ogenschouw neemt, heeft AAV2,3, 3b en 5 ingedeeld in risicogroep 1, en AAV1,4,6, 7-11, 12, po1 en rh10 ingedeeld in risicogroep 2.<sup>24</sup> Het Zwitserse 'Federal Office for the Environment' (FOEN), welke ook de pathogeniteit voor mens, dier en plant in ogenschouw neemt, heeft AAV1-6 als humaan pathogeen en Avian, Bovine, Canine, Equine en Ovine AAV als pathogeen voor zoogdieren ingedeeld in risicogroep 2.<sup>25</sup> Hierbij wordt vermeld dat laboratoriumstammen van AAV2, 3 en 5 die als vectoren gebruikt worden in risicogroep 1 kunnen worden ingedeeld. De Belgische Dienst Bioveiligheid en Biotechnologie (SBB) heeft humane en dieren AAVs ingedeeld als humaan of dierpathogeen in risicogroep 2.<sup>26</sup> De National Institutes of Health (NIH) heeft alle adeno-associated virussen ('AAV-all serotypes') ingedeeld als apathogeen in risicogroep 1.<sup>27</sup>

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

## 7. Overweging en advies

AAVs komen wijdverspreid voor en zijn aangetoond in weefsels van veel verschillende vertebraten, inclusief de mens. Ongeveer 95% van de wereldbevolking is ooit blootgesteld aan AAV2. Van de AAVs die beschreven zijn in het onderhavige advies (AAV10-12, AAVrh10 en AAVpo1), wordt in de literatuur geen melding gemaakt dat deze virussen pathogeen zijn voor mens, dier of plant.

AAVs zijn replicatie-deficiënte virussen, en zijn voor replicatie afhankelijk van co-infectie met een helpervirus (meestal een adenovirus). Zonder de aanwezigheid van een helpervirus integreert het AAV genoom in het chromosoom, of is het episomaal aanwezig in de celkern. Cellen kunnen hierdoor persistent geïnfecteerd zijn met AAVs. Pas wanneer er een superinfectie met een helpervirus optreedt, kunnen AAVs hun levenscyclus weer afmaken. Er zijn geen ziektesymptomen geassocieerd met AAVs en er is nooit aangetoond dat AAVs de klinische symptomen van een adenovirusinfectie verergeren.<sup>8</sup> Er zijn aanwijzingen dat AAVs mogelijk een beschermende functie hebben tegen het ontstaan van kanker.<sup>28</sup>

Op basis van bovengenoemde informatie is de COGEM is van oordeel dat AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh10 en AAVpo1 voldoen aan het eerste criterium van een indeling in pathogeniteitsklasse 1. Mede gezien de afhankelijkheid van de aanwezigheid van een helpervirus, en het ontbreken van aanwijzingen voor pathogeniteit, adviseert de COGEM om alle AAVs vallend onder de soorten *Adeno-associated dependoparvovirus A* en *Adeno-associated dependoparvovirus B* standaard als apathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Wegens de beperkte adviestermijn zijn de overige soorten van het genus *Dependoparvovirus* niet in ogenschouw genomen.

## Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <http://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2017-01-01> (bezocht: 14 maart 2018)
2. International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 13 maart 2018)
3. ICTV Taxonomy history: *Adeno-associated dependoparvovirus A*. Email ratification 2014 (MSL #28) <https://data.ictvonline.org/proposals/2013.001a-aaaV.A.v4.Parvoviridae.pdf> (bezocht: 13 maart 2018)
4. Tijssen P *et al.* (2012). Family Parvoviridae. In: Virus taxonomy, ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
5. Berns KI & Parrish CR (2013). *Parvoviridae*. In: Fields virology, volume 2, 6<sup>th</sup> edition. Edited by Knipe DM en Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
6. Zinn E & Vandenberghe LH (2014). Adeno-associated Virus: Fit to serve. *Curr Opin Virol.* 0: 90–97
7. Salganik M *et al.* (2015). Adeno-associated Virus as a Mammalian DNA Vector. *Microbiol. Spectr.* 3: doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0052-2014
8. Flotte TR & Berns KI (2005). Adeno-associated virus: A ubiquitous commensal of mammals. *Hum. Gene Ther.* 16: 401-407
9. Gao G *et al.* (2003). Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *PNAS* 100: 6081-6086
10. Zincarelli C *et al.* (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* 16: 1073-1080
11. Wu Z *et al.* (2006) Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol. Ther.* 14: 316-327
12. Gonçalves MA (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology J.* doi:10.1186/1743-422X-2-43
13. Berns KI & Muzyczka N (2017). AAV: An overview of unanswered questions. *Hum. Gene Ther.* 28: 308-313
14. Srivastava A (2016). *In vivo* tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol.* 21: 75–80
15. Mori S *et al.* (2004). Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* 330: 375-383
16. Mori S *et al.* (2008). Tissue distribution of cynomolgus adeno-associated viruses AAV10, AAV11, and AAVcy.7 in naturally infected monkeys. *Arch. Virol.* 153: 375-380
17. Schmidt M *et al.* (2008). Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparin sulfate proteoglycan-independent transduction activity. *J. Virol.* 82: 1399-1406
18. Tanguy Y *et al.* (2015). Systemic AAVrh10 provides higher transgene expression than AAV9 in the brain and the spinal cord of neonatal mice. *Front. Mol. Neurosci.* 8:36
19. Twaihe R *et al.* (2015). AAVrh.10 immunogenicity in mice and humans. Relevance of antibody cross-reactivity in human gene therapy. *Gene Ther.* 22: 196-201

20. Bello A *et al.* (2009). Isolation and evaluation of novel adeno-associated virus sequences from porcine tissues. *Gene Ther.* 16: 1320-1328
21. COGEM (2017). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humane- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/170522-03
22. COGEM (2013). Classificatie van humaan- en dierpathogene DNA virussen. COGEM advies CGM/130917-01
23. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) (2015). TRBA 462 Einstufung von Viren in Risikogruppen. <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-462.html> (bezocht: 14 maart 2018)
24. Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (2013). Bekanntmachung der Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten. [https://www.bvl.bund.de/DE/06\\_Gentechnik/03\\_Antragsteller/06\\_Institutionen\\_fuer\\_biologische\\_Sicherheit/01\\_ZKBS/03\\_Organismenliste/gentechnik\\_zkbs\\_organismenliste\\_node.html](https://www.bvl.bund.de/DE/06_Gentechnik/03_Antragsteller/06_Institutionen_fuer_biologische_Sicherheit/01_ZKBS/03_Organismenliste/gentechnik_zkbs_organismenliste_node.html) (bezocht: 14 maart 2018)
25. Federal Office for the Environment (2013). Classification of organisms. <https://www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html> (bezocht: 14 maart 2018)
26. Belgian Biosafety Server. 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.bioveiligheid.be/sites/default/files/h\\_a\\_virus.pdf](https://www.bioveiligheid.be/sites/default/files/h_a_virus.pdf) (bezocht: 14 maart 2018)
27. National Institutes of Health (2016). NIH guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules (NIH guidelines). [https://osp.od.nih.gov/wp-content/uploads/2013/06/NIH\\_Guidelines.pdf](https://osp.od.nih.gov/wp-content/uploads/2013/06/NIH_Guidelines.pdf) (bezocht: 14 maart 2018)
28. Srivastava A & Carter BJ (2017). AAV infection: protection from cancer. *Hum. Gene Ther.* 28: 323-327