

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

DATUM 03 juli 2018
KENMERK CGM/180703-01
ONDERWERP Advies inschaling van werkzaamheden met adenovirale vector met gemuteerde
genoomsequentie van Hepatitis B virus

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier IG 18-092_2.8-000 getiteld 'Generatie en productie van ChAdY25 vector met HBV antigenen' ingediend door Batavia Biosciences B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerde (gg-) adenovirale vector. De adenovirale vector is afgeleid van Chimpanse adenovirus type Y25 (ChAdY25). In de vector is een gemuteerde genoomsequentie van *Hepatitis B virus* (HBV) geïntroduceerd waaruit het grootste gedeelte van het X gen is verwijderd.

Door het ontbreken van de E1 regio kan de adenovirale vector niet vermenigvuldigen, daarnaast ontbreekt ook de E3 regio. De COGEM acht de kans dat er een replicatiecompetent adenovirus (RCA) gevormd wordt, dat de HBV eiwitten tot expressie brengt, verwaarloosbaar klein. Gezien de aangebrachte mutaties in de HBV sequentie, de introductie van een protease splitsingsite in de surface eiwitten en de afwezigheid van functioneel Hbx eiwit, acht de COGEM de kans op vorming van HBV deeltjes verwaarloosbaar klein.

Op basis van de bovenstaande overwegingen en de indeling van ChAdY25 en HBV in pathogeniteitsklasse 2, adviseert de COGEM de voorgenomen werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau uit te voeren. Indien deze werkzaamheden op het geadviseerde inperkingsniveau en onder navolging van de genoemde aanvullende voorschriften worden uitgevoerd, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu, verwaarloosbaar klein zijn.



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

Inschaling van werkzaamheden met adenovirale vector met gemuteerde genomsequentie van *Hepatitis B virus*

COGEM advies CGM/180703-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerde (gg-) adenovirale vector. Deze vector is afgeleid van Chimpansees adenovirus type Y25 (ChAdY25) en door het ontbreken van de E1 regio replicatiedeficiënt. In de ChAdY25 vector is een gemuteerde genomsequentie van *Hepatitis B virus* geïntroduceerd waaruit het grootste gedeelte van het X gen is verwijderd.

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.^{1,2} Binnen adenovirussen worden op basis van hun nucleotidensequentie-overeenkomst, hemagglutinatiefiel en gevoeligheid voor neutraliserende antisera diverse typen onderscheiden.³ Deze serotypen worden aan de hand van een nummer weergegeven. Binnen sommige soorten zijn serotypen met een verschillend gastheertropisme ondergebracht.¹

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 maag-darmstelsel en de ogen, en soms de urinewegen en lever.^{1,3,4} 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.³ Na het doormaken van een infectie, kunnen adenovirussen in de vorm van inert DNA episomaal in de cel en latent in weefsels aanwezig blijven.^{4,5} Besmetting met adenovirus vindt plaats via (in)direct contact, feces en urine, en ten gevolge van aerogene transmissie.^{3,6} Sommige adenovirusinfecties kunnen met behulp van antivirale middelen behandeld worden, maar in veel gevallen zijn deze middelen niet werkzaam.^{1,4,7}

2.2 Structuur en genomische organisatie adenovirussen

Adenovirusdeeltjes bestaan uit een lineair dubbelstrengs DNA molecuul omgeven door een eiwitmantel.^{1,8} De eiwitmantel is opgebouwd uit hexonen, pentonbasen en diverse kleinere eiwitten.^{4,5} In de pentonbasen zijn zogenaamde 'fibers' verankerd. Deze fibers steken uit boven het manteloppervlak en binden aan een receptor op de gastheercel.³ De hexonen, pentonbasen en fibers bezitten antigene determinanten, en spelen een belangrijke rol bij de herkenning door het immuunsysteem.⁴ Het hemagglutinatiefiel- en neutralisatieprofiel van een adenovirus wordt hoofdzakelijk door deze manteeiwitten 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).³

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.^{2,3,4,5} De E1A eiwitten zijn betrokken bij de inductie van de virusrePLICatie 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.⁹ De E2A en E2B eiwitten zijn noodzakelijk voor rePLICatie 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.^{2,3,4} De L regio bevat genen die coderen voor structurele eiwitten die betrokken zijn bij de opbouw van het virusdeeltje.^{2,3} Het 'packaging' signaal ψ is betrokken bij het inpakken van het virale genoom in het virusdeeltje.² RePLICatie en assemblage van het virus vinden plaats in de celkern van de gastheercel.⁴

2.3 Chimpanse adenovirus type Y25 (ChAdY25)

Het adenovirus uit onderhavige aanvraag, Chimpanse adenovirus type Y25 (ChAdY25), is geïsoleerd uit de feces van een chimpansee met hepatitis. Op basis van serologische typering werd in 1969 geconstateerd dat het een adenovirus betrof dat specifiek voorkomt bij chimpansees.¹⁰ Aan de hand van aanvullende serologische typering en op basis van de genoomsequentie, en specifiek de fiber-, hexon- en polymerasequenties, is in 2012 voorgesteld het virus bij de soort *Human mastadenovirus E* onder te brengen.^{11,12} Op dit moment is ChAdY25 nog niet definitief taxonomisch ingedeeld.

3. Hepatitis B virus (HBV)

3.1 Ziektebeeld en overdracht HBV

De natuurlijke gastheren van HBV zijn de mens en hogere primaten.^{13,19} Infectie met HBV vindt plaats via contact met besmette lichaamsvloeistoffen. Het virus dringt binnen door de beschadigde huid of via intacte slijmvliezen. Voorbeelden hiervan zijn 'bloed-bloed' contact ten gevolge van bloedtransfusie met besmette bloedproducten, en prik- en snij-accidenten met HBV-besmet materiaal.^{13,14,15,16} Ook overdracht van HBV van moeder naar kind tijdens de geboorte is mogelijk.¹⁵ Na infectie verspreidt HBV zich via het bloed door het lichaam. Door aanhechting aan specifieke receptoren wordt het virus opgenomen in levercellen waar het kan repliceren.¹³

Een infectie met HBV kan een acute of chronische infectie veroorzaken. Een acute infectie verloopt met of zonder symptomen en geïnfecteerde personen kunnen het virus naar derden

verspreiden. Symptomen die kunnen optreden bij een acute infectie zijn onder andere moeheid, maag-, gewrichts- en spierpijn, en gebrekkige eetlust. In 2015 hadden wereldwijd ongeveer 257 miljoen mensen een chronische HBV-infectie. Een chronische HBV-infectie kan uiteindelijk leiden tot levercirrose en leverkanker.^{13,14,15} Jaarlijks sterven naar schatting 1 miljoen mensen ten gevolge van een HBV infectie.^{13,15}

Wereldwijd is de prevalentie van HBV sterk verschillend.¹⁵ In ontwikkelingslanden met een lage levensstandaard en beperkte medische zorg is de prevalentie hoog.¹⁵ In landen met een hoge levensstandaard, waaronder Nederland, is de prevalentie laag. Hepatitis veroorzaakt door HBV behoort tot de meest frequent voorkomende laboratoriuminfecties.¹⁶

Vaccinatie is de meest effectieve strategie om infectie en verspreiding van HBV onder de bevolking te voorkomen. Sinds 1982 zijn Hepatitis-B-vaccins beschikbaar.¹⁵ Wereldwijd zijn twee behandelstrategieën erkend om chronische hepatitis te behandelen: interferon α en nucleos(t)ide analogen.¹⁷

3.2 Structuur, genomische organisatie en replicatie van HBV

HBV behoort tot de familie *Hepadnaviridae*, genus *Orthohepadnavirus*. *Hepadnaviridae* zijn dubbelstrengs DNA-virussen met een genoom van ruim 3 kb, waarbij de + streng korter is dan de - streng DNA. Het genoom van HBV bevat vier overlappende ‘open reading frames’ (ORF’s): precore/core (preC/C), polymerase (P), env of surface (preS/S) en het X gen.^{18,19,20}

Het preC/C ORF codeert voor het ‘core’ eiwit, dat aanwezig is in het nucleocapside, en voor het ‘precore’ eiwit. Het ‘precore’ eiwit kan worden aangetroffen in het serum van geïnfecteerde individuen als het e antigeen.^{18,19} Het P ORF omvat 80% van het genoom en codeert voor het P-eiwit. Het preS/S gen is één groot ORF dat drie ‘in frame’ startcodons bevat. Dit verdeelt het gen in 3 secties; pre-S1, pre-S2 en S. Afhankelijk vanaf welk startcodon de translatie begint, wordt het ‘small’ (S) eiwit, het ‘middle’ (M) eiwit (preS2/S) of het ‘large’ (L) eiwit (preS1/preS2/S) geproduceerd. Deze drie eiwitten worden in het buitenmembraan van het virus geïncorporeerd.^{18,19} Het X gen codeert voor het niet-structurele HBx eiwit welke HBV replicatie en transcriptie stimuleert.²⁰

Replicatie van HBV verloopt via een RNA intermediair. Na infectie wordt in de celkern de + DNA streng verlengd door de cellulaire DNA polymerases, en wordt het virale DNA omgezet naar ‘covalently closed circular’ DNA (cccDNA). Van dit DNA wordt door cellulair RNA polymerase een volledige lengte ‘pregenomic’ (pg) RNA afgeschreven. Dit pgRNA dient als template voor verdere DNA synthese door het virale P-eiwit. In het 5’-einde van pgRNA bevindt zich het cis-element ϵ . Dit is een ‘stem-loop’ structuur die betrokken is bij P-eiwit afhankelijke encapsidatie in het nucleocapside. Daarnaast fungeert ϵ als replicatie ‘origin’. Zo vormt binding van het P-eiwit aan ϵ de initiatie van reverse transcriptie.²¹

Het P-eiwit is een reverse transcriptase die zorgt voor replicatie van het HBV genoom en speelt daarnaast ook een belangrijke rol bij de assemblage van het virus.^{18,19,24,25} De reverse transcriptase stap vindt plaats in (incomplete) virusdeeltjes ‘progeny capsids’.

4. Voorgenomen werkzaamheden

Adenovirale vectoren worden bij laboratoriumwerkzaamheden veelvuldig gebruikt als een effectief genoverdrachtsysteem. De aanvrager is voornemens gebruik te maken van een vector die is afgeleid van ChAdY25, genaamd ChAdY25-HBV. Dit is een zogenaamde ‘eerste generatie’ replicatie-deficiënte AdV vector, waarin zich een deletie in de E1 regio bevindt. Hierdoor is de virale vector replicatiedeficiënt.²² Verder ontbreekt in ChAdY25-HBV ook de E3 regio.

De aanvrager is voornemens op de plek van de E1 regio een expressiecassette met een gemuteerde genoomsequentie van HBV te introduceren. De gebruikte HBV genoomsequentie is synthetisch geproduceerd en humaan codon geoptimaliseerd. Uit de genoomsequentie van HBV is het grootste gedeelte van het X gen verwijderd, het resterende gedeelte codeert voor een partieel Hbx-eiwit welke ten opzichte van de wildtype sequentie 14 mutaties bevat en slechts 23 aminozuren lang is. Het X gen codeert voor het niet-structurele HBx eiwit welke HBV replicatie en transcriptie stimuleert.²³

Voor replicatie van het HBV genoom is het P-eiwit essentieel omdat deze het pgRNA als template gebruikt voor verdere DNA synthese.^{18,19,24,25} De aanvrager heeft acht mutaties aangebracht in de genesequentie coderend voor het P-eiwit met als doel om de activiteit van het P-eiwit te verminderen of te blokkeren. Deze mutaties betreffen drie aminozuursubstituties (R703A, D777A en R781A) in het RNase H domein, een substitutie in het TP domein (Y63A) en vier substituties in de ‘spacer region’ (C323A, C334A, C338A en C352A) van het P-eiwit.^{24,25,26} De aanvrager stelt dat deze acht mutaties het zeer aannemelijk maken dat het P-eiwit niet meer functioneel is.

Ook zijn er een 12-tal nucleotideveranderingen aangebracht in de ϵ sequentie van het HBV genoom. ϵ speelt een belangrijke rol bij de initiatie van pgRNA encapsidatie en replicatie.²¹ De aangebrachte mutaties leiden er volgens de aanvrager toe dat ϵ hoogstwaarschijnlijk niet meer functioneel is.

Daarnaast heeft de aanvrager de 2A peptide sequentie van *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV) en een ‘furin cleavage site’ geïntroduceerd tussen de pre-S1 en pre-S2 secties van het preS/S gen van HBV. Dit moet er voor zorgen dat de virale oppervlakte-eiwitten M en L door cellulaire proteases zullen worden gesplitst. Hierdoor kan er volgens de aanvrager geen vorming van ‘virus-like particles’ plaatsvinden.

Ten slotte is het ‘precore’ eiwit N-terminaal voorzien van een Sli sequentie, en het pre-S1 eiwit van een TPA sequentie. Sli is een gedeelte van de ‘shark li’ sequentie van de ‘shark invariant chain’ van het MHC II molecuul en TPA is de ‘leader peptide’ van ‘tissue plasminogen activator protein’. TPA en Sli moeten volgens de aanvrager fungeren als immuunstimulerende elementen.

5. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft in 2010 geadviseerd dat HBV als een klasse 2 pathogeen beschouwd kan worden omdat er een effectief vaccin beschikbaar is.²⁷ Daarnaast kan het virus niet makkelijk in de bevolking verspreiden. Hepatitis veroorzaakt door HBV behoort tot de meest frequent voorkomende laboratoriuminfecties. De COGEM heeft daarom geadviseerd om de werkzaamheden met HBV uit te voeren op ML-II inperkingsniveau, open handelingen met HBV uit te voeren in een veiligheidskabinet

van klasse 2 en tijdens de werkzaamheden de handschoen over de mouw van de werkkleding te dragen.²⁷

In 2017 is ChAdY25 door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. Hoewel er geen aanwijzingen zijn dat mensen ziek worden van bij apen voorkomende adenovirussen, kan niet uitgesloten worden dat zij ermee geïnfecteerd kunnen worden. De COGEM beschouwt ChAdY25 daarom niet als een strikt dierpathogeen.²⁸

In 2014 heeft de COGEM geadviseerd over deels vergelijkbare werkzaamheden met een adenovirale vector (HAd5) waarin de E1- en E3 regio's ontbraken, en de complete genoomsequentie van HBV geïntroduceerd was op de positie van de E1 regio.²⁹ Het betrof de productie van de replicatiedefectieve gg-virusdeeltjes (AdHBV) en de infectie van muizen met AdHBV. De aanvrager verzocht om de werkzaamheden op ML-II/DM-II uit te voeren. De COGEM kon hier niet mee instemmen en kwam, op basis van de aangeleverde informatie, tot het advies om de werkzaamheden op DM-III/ML-III uit te voeren. De belangrijkste redenen hiervoor waren dat niet kon worden uitgesloten dat AdHBV kon repliceren in humane levercellen, en de mogelijke aanwezigheid van replicatiecompetente adenovirussen (RCA). Eén van de argumenten waarom HBV in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld is, is dat HBV niet makkelijk onder de bevolking kan verspreiden. Op basis van de beschikbare informatie kon niet worden uitgesloten dat infectieuze AdHBV deeltjes gevormd konden worden die via de aerogene route konden worden overgedragen en daardoor makkelijker konden verspreiden.

6. Overweging

6.1 Replicatiedeficiëntie ChAdY25-HBV

ChAdY25-HBV is replicatiedeficiënt omdat de E1 regio ontbreekt, daarnaast ontbreekt ook de E3 regio. De E1 regio codeert voor het E1A eiwit, welke kan binden aan het Rb eiwit van de gastheercel waardoor E2F wordt vrijgemaakt. Vervolgens activeert E2F de adenovirale E2 promoters, waardoor de eiwitten die nodig zijn voor virale DNA synthese geproduceerd kunnen worden. In de wetenschappelijke literatuur is beschreven dat het HBx eiwit van HBV mogelijk ook E2F kan vrijmaken.³⁰ In ChAdY25-HBV resteert slechts een klein gedeelte van het X gen in de HBV genoomsequentie. Het resterende partiele Hbx-eiwit dat mogelijk tot expressie kan komen, bevat 14 mutaties ten opzichte van de wildtype sequentie en is slechts 23 aminozuren lang. Om deze reden acht de COGEM het zeer onwaarschijnlijk dat er functioneel HBx eiwit gevormd kan worden, en acht ze het risico dat het replicatiedeficiënte karakter van ChAdY25-HBV zou kunnen worden opgeheven verwaarloosbaar klein.

6.2 Kans op vorming van replicatiecompetent adenovirus (RCA) tijdens de productie en vermeerdering

Aangezien ChAdY25-HBV door de verwijdering van de E1 regio niet meer in staat is tot replicatie, is er een helpercellijn noodzakelijk voor de productie en vermeerdering van deze adenovirale vector. In de onderhavige aanvraag zal voor de productie gebruik gemaakt worden van de helpercellijn HEK293(TetR). Voor de vermeerderingswerkzaamheden in een bioreactor zal daarnaast ook gebruik

worden gemaakt van de cellijnen 911 en A549. De aanvrager heeft geen direct bewijs aangeleverd om aan te tonen dat er geen RCA wordt gevormd tijdens deze werkzaamheden.

Wat betreft de A549 cellen is de COGEM van oordeel dat, hoewel deze cellen wel geïnfecteerd kunnen worden, er gezien het ontbreken van de E1 regio in deze cellijn geen RCA gevormd zal worden. In de andere cellijnen komt de HAdV-5 E1 regio wel tot expressie. Zo bevat HEK293(/TetR) nucleotide 1-4344 van de E1 regio van HAdV-5 en bevat 911 nucleotide 79-5789.³¹

De aangeleverde sequentiegegevens laten zien dat er een beperkte homologie (60%) is tussen de sequenties van de E1 regio van HEK293(/TetR) en het genoom van ChAdY25-HBV. De COGEM acht de kans derhalve zeer klein dat bij de productie en vermeerdering homologe recombinatie tussen ChAdY25-HBV en HEK293(/TetR) kan plaatsvinden waarbij RCA gevormd kan worden. De homologie van ChAdY25-HBV met de E1 regio van 911 is vergelijkbaar met die van HEK293(/TetR). Derhalve acht de COGEM de kans dat er tijdens de vermeerderingswerkzaamheden homologe recombinatie tussen ChAdY25-HBV en 911 kan plaatsvinden waarbij RCA gevormd kan worden eveneens zeer klein.

De COGEM merkt op dat zelfs als er recombinatie optreedt en ChAdY25-HBV de E1 regio zou verwerven dit hoogstwaarschijnlijk ten koste gaat van de HBV expressiecassette. Daarnaast zal door het ontbreken van de E3 regio het gevormde RCA geattenueerd zijn.²² Al het bovenstaande in overweging nemende acht de COGEM de kans dat er een RCA gevormd wordt, dat de eiwitten van HBV tot expressie brengt, verwaarloosbaar klein.

6.3 Vorming van HBV deeltjes

De aanvrager heeft een aantal maatregelen genomen die de vorming van HBV deeltjes zouden moeten voorkomen.

Ten eerste heeft de aanvrager acht mutaties aangebracht in de sequentie van het P-eiwit. Het P-eiwit is essentieel voor HBV replicatie omdat deze het pgRNA als template gebruikt voor verdere DNA synthese.^{18,19,24,25} De aangebrachte mutaties betreffen drie aminozuursubstituties (R703A, D777A en R781A) in het RNase H domein, een substitutie in het TP domein (Y63A) en vier substituties in de 'spacer region' (C323A, C334A, C338A en C352A) van het P-eiwit.^{32,33,34} De aanvrager stelt dat deze acht mutaties er hoogstwaarschijnlijk voor zorgen dat het P-eiwit niet meer functioneel is en baseert zich hiervoor op drie publicaties waarin P-eiwit mutanten in *in vitro* experimenten op functionaliteit zijn getest.^{24,25,26}

De COGEM merkt op dat niet alle acht substituties zijn geanalyseerd in de betreffende publicaties en dat de mutaties niet in combinatie zijn getest. Daarnaast is de activiteit van de P-eiwit mutanten slechts in *in vitro* experimenten onderzocht. De aanvrager levert geen direct bewijs voor de afwezigheid van activiteit van de door hem geconstrueerde P-eiwit mutant. Echter, de COGEM acht het zeer aannemelijk dat de combinatie van alle acht substituties een additief effect zal hebben en dat dit zal resulteren in inactivatie danwel sterke attenuatie van het P-eiwit.

Ten tweede heeft de aanvrager 12 nucleotideveranderingen aangebracht in de ϵ sequentie van het HBV genoom. ϵ speelt een belangrijke rol bij de initiatie van pgRNA encapsidatie en replicatie.²¹ De

COGEM acht het zeer aannemelijk dat de aangebrachte mutaties er voor zullen zorgen dat ϵ sequentie niet meer functioneel is en dat ϵ daardoor geen rol meer kan spelen bij de initiatie van pgRNA encapsidatie en replicatie.

Ten derde heeft de aanvrager een FMDV 2A peptide sequentie en een 'furin cleavage site' geïntroduceerd tussen de pre-S1 en pre-S2 secties van het preS/S gen. Dit moet er voor zorgen dat de virale oppervlakte-eiwitten M en L door cellulaire proteases zullen worden gesplitst. Afwezigheid van de M- en L-eiwitten voorkomt de vorming van HBV deeltjes.³⁵ Hoewel de aanvrager geen ondersteunend bewijs levert om aan te tonen dat er splitsing van de virale oppervlakte-eiwitten *in vivo* optreedt, acht de COGEM het aannemelijk dat dit zal plaatsvinden.

Concluderend, gezien de aangebrachte mutaties in het P-eiwit en de ϵ sequentie, de introductie van de FMDV 2A peptide sequentie en furin site, en de eerder genoemde afwezigheid van functioneel Hbx eiwit, acht de COGEM de kans op de vorming van HBV deeltjes verwaarloosbaar klein.

6.4 Vorming van infectieus replicatiedeficiënt adenovirus in de medewerker

Replicatie en eventuele uitscheiding van gg-ChAdY25-HBV deeltjes in de medewerker is alleen mogelijk als dezelfde cel door zowel gg-ChAdY25-HBV als door een wildtype adenovirus geïnfecteerd is. In deze situatie kan het wildtype adenovirus de functie van de ontbrekende E1 regio complementeren en is in theorie vermenigvuldiging van gg-ChAdY25-HBV deeltjes mogelijk. De COGEM wijst er op dat door het replicatie-deficiënte karakter van de gg-ChAdY25-HBV er geen verdere verspreiding van de deeltjes in het milieu zal kunnen optreden. Ook acht de COGEM de kans zeer klein dat dezelfde cel door zowel gg-ChAdY25-HBV als door een wildtype adenovirus geïnfecteerd wordt.

7. Advies

De COGEM is van oordeel dat de kans dat er een RCA gevormd wordt die HBV tot expressie brengt en de kans op het ontstaan van HBV deeltjes beide verwaarloosbaar klein zijn. Gezien de bovenstaande overwegingen en de indeling van ChAdY25 en HBV in pathogeniteitsklasse 2, adviseert de COGEM de voorgenomen werkzaamheden (productie en vermeerdering) met ChAdY25-HBV uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. De COGEM stemt in met het voorstel van de aanvrager om hierbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Open handelingen dienen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet van klasse-II;
- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen.

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

8. Additionele opmerking

De COGEM merkt op dat het onderhavige dossier op verschillende punten te wensen overlaat. Zo is de informatie in het dossier met betrekking tot de genomische organisatie en functionaliteit van de elementen in ChAdY25-HBV zeer beperkt. Ook doet de aanvrager verschillende beweringen zonder deze toe te lichten en te onderbouwen met ondersteunende gegevens. Ondanks het gebrekkige dossier heeft de COGEM middels uitvoerig aanvullend literatuuronderzoek en eigen expertise de mogelijke risico's voor mens en milieu van de voorgenoemde werkzaamheden kunnen beoordelen.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 16 maart 2018)
2. Berk AJ (2013). *Adenoviridae*. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
3. 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
4. Wold WSM & Ison MG (2013). Adenoviruses. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
5. Bergmans JEN *et al.* (2017). Omlaagschaling van werkzaamheden met replicatie-defectieve AAV- en adenovirale vectoren. COGEM rapport CGM 2017-4
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. McConnell MJ & Imperiale MJ (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 15: 1022-1033
9. De Vrij J *et al.* (2011). Enhanced transduction of CAR-negative cells by protein IX-gene deleted adenovirus 5 vectors. *Virology* 410: 192–200
10. Hillis WD *et al.* (1969). Serologic classification of chimpanzee adenoviruses by hemagglutination and hemagglutination inhibition. *J. Immunol.* 103: 1089-1095
11. Dicks MDJ *et al.* (2012). A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity. *PLoS ONE* 7:1-12
12. Wigand R *et al.* (1989). Chimpanzee adenoviruses are related to four subgenera of human adenoviruses. *Intervirology* 30: 1–9
13. Ganem D & Schneider RJ (2001). *Hepadnaviridae: The viruses and their replication*. In: Fields Virology, volume 2, fourth edition. Edited by Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia. 2923-3036
14. RIVM. Hepatitis B. https://www.rivm.nl/Onderwerpen/H/Hepatitis_B#progressive_scheme (bezoekt: 29 juni 2018)

15. WHO (2017). Global hepatitis report, 2017.
<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255016/9789241565455-eng.pdf;jsessionid=F7E114DA99EB669CC3196BCF1302A8D6?sequence=1> (bezocht: 29 juni 2018)
16. Sewell DL (1995). Laboratory-associated infections and biosafety. *Clinical Microbiological Reviews* 8: 389-405
17. Urban S *et al.* (2010). The replication cycle of *Hepatitis B virus*. *J. of Hepatology* 52: 282-284
18. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). ICTV 9th Report (2011). Hepadnaviridae.
https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/reverse-transcribing-dna-and-rna-viruses-2011/w/rt_viruses/155/hepadnaviridae (bezocht: 21 juni 2018)
19. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Family *Hepadnaviridae*. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
20. Xu Q *et al.* (2018). The biological function of *Hepatitis B virus* X protein in hepatocellular carcinoma. *Oncol. Res.* doi: 10.3727/096504018X15278771272963
21. Beck J & Nassal M (2007). *Hepatitis B virus* replication. *World J. Gastroenterol.* 13: 48-64
22. COGEM (2018). Generiek advies inschaling replicatie-deficiënte adenovirale vectorsystemen. COGEM advies CGM/180316-01
23. Xu Q *et al.* (2018). The biological function of *Hepatitis B virus* X protein in hepatocellular carcinoma. *Oncol. Res.* doi: 10.3727/096504018X15278771272963
24. Ko C *et al.* (2014). Residues Arg703, Asp777, and Arg781 of the RNase H domain of hepatitis B virus polymerase are critical for viral DNA synthesis. *J. Virol.* 88: 154-163
25. Jones SA & Hu J (2013). Hepatitis B virus reverse transcriptase: diverse functions as classical and emerging targets for antiviral intervention. *Emerg. Microbes Infect.* 2: e56. doi: 10.1038/emi.2013.56
26. Kim S *et al.* (2009). Four conserved cysteine residues of the hepatitis B virus polymerase are critical for RNA pregenome encapsidation. *J. Virol.* 83: 8032-8040
27. COGEM (2010). Classificatie Hepatitis B virus en inschaling werkzaamheden genetisch gemodificeerd Hepatitis B virus. COGEM advies CGM/100706-01
28. COGEM (2017). Classificatie van twee chimpansee adenovirussen en inschaling van werkzaamheden met hiervan afgeleide gg-adenovirale vectoren. COGEM advies CGM/170123-01
29. COGEM (2014). Replicatiedefectieve adenovirale vector met het complete genoom van Hepatitis B virus. CGM/170707-01
30. Wang WH *et al.* (2008). Hepatitis B virus X protein via the p38MAPK pathway induces E2F1 release and ATR kinase activation mediating p53 apoptosis. *J. Biol. Chem.* 283: 25455-67
31. Kovesdi I & Hedley SJ (2010). Adenoviral producer cells. *Viruses* 2: 1681-1703
32. Ko C *et al.* (2014). Residues Arg703, Asp777, and Arg781 of the RNase H domain of hepatitis B virus polymerase are critical for viral DNA synthesis. *J. Virol.* 88: 154-163
33. Jones SA & Hu J (2013). Hepatitis B virus reverse transcriptase: diverse functions as classical and emerging targets for antiviral intervention. *Emerg. Microbes Infect.* 2: e56. doi: 10.1038/emi.2013.56
34. Kim S *et al.* (2009). Four conserved cysteine residues of the hepatitis B virus polymerase are critical for RNA pregenome encapsidation. *J. Virol.* 83: 8032-8040

35. Ueda K *et al.* (1991). Three envelope proteins of hepatitis B virus: large S, middle S, and major S proteins needed for the formation of Dane particles. *J. Virol.* 65: 3521-3529