

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw J.C. Huizinga-Heringa
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 7 juli 2010
KENMERK CGM/100707-01
ONDERWERP Advies: Classificatie en inschaling van Hepatitis delta virus

Geachte mevrouw Huizinga-Heringa,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een vergunningaanvraag van Crucell Holland B.V. met als titel 'Generatie en gebruik van *Hepatitis-delta-virus* met verschillende hepatitis-B oppervlakte-eiwitten', deelt de COGEM u het volgende mee:

Samenvatting

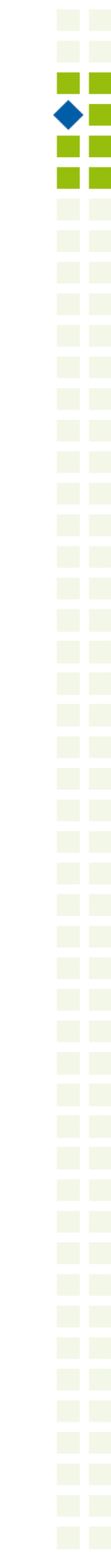
De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van het *Hepatitis-delta-virus* (HDV). Tevens is zij verzocht advies uit te brengen over het inperkingsniveau waarop de *in vitro* werkzaamheden met genetisch gemodificeerd HDV ingeschaald dient te worden.

Het HDV is een defectief virus dat alleen in aanwezigheid van het *Hepatitis-B-virus* (HBV) in staat is om in menselijke cellen te vermenigvuldigen en infectieuze virusdeeltjes te produceren. Op dit moment zijn er wereldwijd ongeveer 350 miljoen mensen met een chronische HBV-infectie, waarvan ongeveer 15 tot 20 miljoen mensen tevens geïnfecteerd zijn met HDV. Patiënten die geïnfecteerd zijn met beide virussen ontwikkelen vaak een hevigere vorm van leverontsteking (hepatitis) dan patiënten die alleen geïnfecteerd zijn met HBV. Sinds de jaren tachtig van de vorige eeuw is er een effectief vaccin beschikbaar tegen HBV. Hierdoor is ook het aantal infecties met HDV sterk afgenomen.

Gezien de beschikbaarheid van een effectief vaccin voor HBV en het feit dat het HDV van HBV afhankelijk is voor de vermenigvuldiging en de productie van infectieuze virusdeeltjes, adviseert de COGEM het HDV te classificeren als klasse 2 pathogeen.

Gebaseerd op deze indeling kan de COGEM instemmen met de door aanvrager voorgestelde inschaling van de *in vitro* werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II. Om de mogelijke transmissie van het virus te voorkomen, vindt de COGEM dat open handelingen in een veiligheidskabinet klasse II uitgevoerd moeten worden. Daarnaast acht de COGEM het dragen van handschoenen tot over de mouw van de werkkleding, vaccinatie van de werknemers tegen HBV en controle op een afdoende antistof-titer noodzakelijk.

Op genoemd inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden 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. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Classificatie van *Hepatitis delta virus* en inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerde HDV deeltjes

COGEM advies CGM/100707-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de classificatie van het *Hepatitis-delta-virus* (HDV) en de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met genetisch gemodificeerd HDV (gg-HDV). De aanvraag is ingediend door Crucell Holland B.V. en is getiteld: ‘*Generatie en gebruik van Hepatitis delta virus met verschillende Hepatitis B oppervlakte-eiwitten.*’

Parallel aan deze aanvraag is de COGEM verzocht te adviseren over de classificatie van het *Hepatitis-B-virus* (HBV) en de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met genetisch gemodificeerd HBV (gg-HBV). Ook deze aanvraag is ingediend door Crucell Holland B.V. Beide aanvragen worden met een apart advies behandeld.

De voorgenomen werkzaamheden in de huidige adviesvraag betreffen de *in vitro* productie van infectieuze HDV deeltjes met de oppervlakte-eiwitten van het HBV. De geproduceerde HDV deeltjes wil de aanvrager gebruiken voor de analyse van neutraliserende antilichamen die gericht zijn tegen de HBV oppervlakte-eiwitten. Tevens zullen virus-receptor interacties geanalyseerd worden.

Kenmerken van hepatitis

Virale hepatitis is een algemene term voor leverontstekingen die veroorzaakt worden door verschillende virussen, waaronder het hepatitis A, B, C, D en E virus. Deze virussen behoren allemaal tot een andere virusfamilie en variëren qua genoom, besmettelijkheid en aard van de klachten. Het HBV bevat als enige een DNA genoom. De andere virussen bevatten ofwel een positief enkelstrengs RNA genoom (A, C en E), ofwel een negatief enkelstrengs RNA genoom (D).

Veel mensen hebben na besmetting met één van de hepatitis virussen helemaal geen klachten, terwijl andere mensen last krijgen van vermoeidheid, koorts, spier- en gewrichtspijnen, misselijkheid en buikpijn. Ook kunnen kleurverandering van urine, ontlasting, ogen en huid (geelzucht) optreden.¹

Van alle genoemde virustypen wordt HBV het meest frequent aangetroffen in de wereldbevolking. Wereldwijd zijn bijna 2 miljard mensen geïnfecteerd met HBV, waarvan meer dan 350 miljoen mensen een chronische HBV-infectie hebben. Een chronische HBV-infectie kan, naast de eerder genoemde klachten, uiteindelijk leiden tot levercirrose en leverkanker. Levercirrose is een aandoening waarbij gezonde levercellen afsterven en vervangen worden door littekenweefsel.^{2,3}

Verspreiding van HBV vindt onder andere plaats via onveilig seksueel contact met een geïnfecteerde persoon, transfusie van gecontamineerd bloed of gecontamineerde bloedproducten of door gedeeld gebruik van gecontamineerde naalden onder intraveneuze drugsgebruikers. Ook verticale transmissie van moeder naar kind tijdens de geboorte is mogelijk.⁹ Door de wereldwijde

introductie van HBV-vaccinatie in de jaren tachtig van de vorige eeuw is het aantal infecties van HBV drastisch afgenomen.

Van de 350 miljoen mensen met een chronische HBV-infectie, zijn ongeveer 15 tot 20 miljoen mensen tevens geïnfecteerd met het *Hepatitis delta virus*.²

Hepatitis delta virus

HDV is het enige lid van het genus *Deltavirus*. Het is een defectief RNA virus dat alleen in aanwezigheid van het HBV in staat is te repliceren en infectieuze virusdeeltjes te vormen. Hiervoor maakt het HDV gebruik van de oppervlakte-eiwitten van het HBV die in het lipidemembraan van HDV zijn opgenomen. Deze oppervlakte-eiwitten worden ook wel Hepatitis B surface Antigens (HBsAg) genoemd en zijn onder andere verantwoordelijk voor de binding van het virus aan de gastheer cel.⁴

HDV heeft een circulair negatief enkelstrengs RNA genoom van ongeveer 1700 nucleotiden. Het HDV RNA bevat zes open leesramen; drie op de genomische RNA streng en drie op de complementaire 'antigenomische' RNA streng. Slechts één open leesraam op de 'antigenomische' RNA streng wordt voor zover bekend actief afgelezen en codeert voor het virus specifieke nucleocapside-eiwit genaamd hepatitis delta antigen.⁵

Van het hepatitis delta antigen bestaan twee verschillende isovormen: het kleine delta antigen (HDAg-S) met een lengte van ongeveer 155 aminozuren en het grote delta antigen (HDAg-L) met een lengte van ongeveer 214 aminozuren.² Een enkele nucleotide verandering in de coderende sequentie van het kleine delta antigen leidt tot de synthese van het grote delta antigen. Deze nucleotideverandering staat onder controle van het enzym 'double stranded RNA adenosine deaminase' afkomstig van de gastheer.^{5,6} Het kleine delta antigen is betrokken bij de replicatie van HDV. Het grote delta eiwit remt de replicatie van HDV en is tevens betrokken bij de formatie van virusdeeltjes.⁵

Pathogeniteit van *Hepatitis delta virus*

In de jaren zeventig werd bij een groep Italiaanse patiënten met een chronische hepatitis B infectie een nieuw antigen ontdekt dat de naam delta antigen kreeg. De aanwezigheid van dit antigen bleek nauw samen te hangen met een verheviging van het ziektebeeld bij bepaalde patiënten met een chronische hepatitis B infectie. In de jaren tachtig kwam men tot de conclusie dat het HDV hiervoor verantwoordelijk was.⁷

HDV infecteert van nature alleen de mens. Onder laboratoriumomstandigheden is ook besmetting van chimpansees mogelijk gebleken.⁷ HDV verspreidt zich op dezelfde wijze als HBV en veroorzaakt alleen ziekte bij mensen die geïnfecteerd zijn met HBV. Het HDV maakt gebruik van de HBV oppervlakte-eiwitten om cellen te kunnen infecteren. De ernst van een HDV infectie hangt ervan af of co-infectie of superinfectie optreedt. In het eerste geval is de patiënt gelijktijdig met beide virussen geïnfecteerd, in het tweede geval is de patiënt al eerder geïnfecteerd geraakt met HBV en vervolgens met HDV.^{2,9}

De klinische verschijnselen van een co-infectie kunnen variëren van milde tot ernstige hepatitis. De kans op de ontwikkeling van een chronische leveraandoening is bij een co-infectie

klein.^{8,9} Een superinfectie leidt tot acute hepatitis en tevens tot een sterk verhoogde kans op de ontwikkeling van chronische leverziekte, waaronder levercirrose en leverkanker.^{8,9}

Een factor die het verloop van de ziekte kan beïnvloeden, is het genotype van het virus. Het genotype heeft mogelijk invloed op de efficiency van virusformatie met HBsAg.⁶ Op dit moment zijn er acht verschillende genotypen van het HDV bekend.⁶ Genotype 1 komt het meest frequent voor en wordt waargenomen in Europa, het Midden-Oosten, Noord-Amerika en Noord-Afrika. HDV genotype 2 wordt voornamelijk waargenomen in het verre Oosten en type 3 komt uitsluitend voor in Zuid-Amerika. Genotype 4 tot 8 worden met name aangetroffen in Afrikaanse patiënten.²

Door de wereldwijde introductie van HBV vaccinatie in de jaren tachtig van de vorige eeuw is het aantal infecties van HBV en daarmee ook van HDV drastisch afgenomen.

Classificatie

Volgens de 'Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen' worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.¹⁰ Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde micro-organismen van die klasse. De criteria zijn als volgt gedefinieerd:

- Een **indeling in pathogeniteitsklasse 1** is van toepassing op een micro-organisme dat in ieder geval voldoet aan een van de volgende voorwaarden:
 - o het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant;
 - o het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
 - o 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;
 - o van het micro-organisme is het niet-virulente karakter middels adequate tests aangetoond.

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

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

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

Het HDV wordt door de Duitse ‘Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit’ (ZKBS) en de Public Health Agency of Canada ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.^{11,12} Door de Belgian Biosafety Server worden werkzaamheden met HDV ingeschaald op BSL-3 niveau.¹³

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft nog niet eerder advies uitgebracht over werkzaamheden met gg-HDV. Wel heeft de COGEM in 2009 geadviseerd over de classificatie van het *Hepatitis C virus* (HCV). Vanwege de ernst van de ziekte die HCV veroorzaakt en vanwege de afwezigheid van een effectieve behandeling of vaccin tegen HCV, heeft de COGEM geadviseerd om het HCV als een klasse 3 pathogeen in te schalen.

Parallel aan dit advies heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van het *Hepatitis B virus* (HBV) en de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met genetisch gemodificeerd HBV (gg-HBV). De COGEM heeft geadviseerd om het HBV als een klasse 2 pathogeen in te schalen.

Werkzaamheden met het GGO

De aanvrager is voornemens neutraliserende antistoffen te analyseren die gericht zijn tegen het HBV. Hiervoor wil de aanvrager gebruik maken van HDV deeltjes die de oppervlakte-eiwitten van HBV tot expressie brengen. De expressieconstructen die nodig zijn voor het genereren van HDV deeltjes met de oppervlakte-eiwitten van HBV worden geproduceerd in *Escherichia coli*. Tijdens deze kloneringswerkzaamheden wordt er nog geen virus geproduceerd en komen er ook geen virale eiwitten tot expressie.

Het gg-HDV wordt geproduceerd door de expressieconstructen met het gehele genoom van HDV te co-transfecteren in animale cellen met de expressieconstructen die coderen voor de oppervlakte-eiwitten van het *Hepatitis B virus*.

Na co-transfectie van de expressieconstructen in verschillende animale cellen ontstaan er infectieuze HDV deeltjes met HBsAg aan de oppervlakte. De aanvrager wil met deze infectieuze gg-HDV deeltjes humane levercellen of humane primaire hepatocyten infecteren om de neutraliserende activiteit van therapeutische antistoffen tegen de HBV oppervlakte-eiwitten te meten.

Overweging en advies

Classificatie van Hepatitis delta virus

Het HDV is voor zijn replicatie en vorming van infectieuze virusdeeltjes volledig afhankelijk van het HBV. Patiënten die geïnfecteerd zijn met beide virussen ontwikkelen vaak een heviger vorm

van hepatitis dan patiënten die alleen geïnfecteerd zijn met HBV.⁷ Infectie met alleen HDV levert geen ziektebeeld op.

De verspreiding van HDV vindt, net als bij HBV, voornamelijk plaats via bloed-bloed en onveilig seksueel contact of via besmette injectienaalden. Het aantal infecties met het HDV is door de wereldwijde introductie van HBV vaccinatie in de jaren tachtig van de vorige eeuw drastisch afgenomen.

Gezien de aard van het virus, de aanwezigheid van een effectief vaccin tegen HBV dat tevens bescherming biedt tegen een HDV en het feit dat het virus moeilijk overdraagbaar is, adviseert de COGEM het HDV te classificeren als klasse 2 pathogeen.

Inschaling van werkzaamheden met gg-HDV

Volgens de aanvrager zullen de handelingen plaatsvinden met vectoren die functioneel HDV kunnen vormen. Dit HDV kan alleen repliceren en infectieuze deeltjes vormen in personen die ook zijn geïnfecteerd met HBV. Volgens de aanvrager zullen de werkzaamheden alleen door HBV gevaccineerde personen uitgevoerd worden, waarvan tevens is aangetoond dat ze geen dragers zijn van HBV. Bovendien zal het gebruik van naalden uitgesloten worden. De aanvrager geeft aan werkzaamheden met gg-HDV onder ML-II inperkingsniveau uit te gaan voeren.

Gebaseerd op de indeling van HDV in pathogeniteitsklasse 2 en conform de regeling GGO is de COGEM van mening dat de kloneringswerkzaamheden op inperkingsniveau ML-I en de werkzaamheden met gg-HDV op inperkingsniveau ML-II uitgevoerd kunnen worden. Om de mogelijke transmissie van het virus te voorkomen, vindt de COGEM dat open handelingen in een veiligheidskabinet klasse 2 uitgevoerd moeten worden. Daarnaast acht de COGEM het dragen van handschoenen tot over de mouw van de werkkleding noodzakelijk om te voorkomen dat het virus via eventueel aanwezige wondjes het lichaam kan binnendringen. Tevens acht de COGEM vaccinatie van werknemers tegen HBV en controle op een afdoende antistof-titer noodzakelijk. Voor de analyse van de antistof-titer zijn in alle ziekenhuizen standaard procedures aanwezig.

De COGEM is van mening dat op bovengenoemd inperkingsniveau en door het hanteren van de gegeven aanvullende voorschriften de risico's van voorgenomen handelingen met het gg-HDV voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Nationaal Hepatitis Centrum. www.hepatitis.nl (30-6-10)
2. Wedemeyer H & Manns M (2010). Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol* 7: 31-40
3. Ganem D & Schneider RJ (2001). *Hepadnaviridae: The viruses and their replication* In: Fields virology, volume two, fourth edition. Knipe DM et al. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
4. Sureau *et al* (1993). Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *J.Virol* 67: 366-372
5. Gerin *et al* (2001). Hepatitis Delta Virus. In: Fields virology, volume two, fourth edition. Knipe DM et al. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
6. Rizetto M (2009). Hepatitis D: thirty years after. *J.Hep* 50: 1043-1050
7. Taylor JM (2006). Hepatitis delta virus. *J.Virol* 344: 71-76

8. Gunsar F (2009). Delta hepatitis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 7: 499-501
9. World Health Organisation (2001). Hepatitis Delta. [ww.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisD_who.cdscsrncs2001_1.pdf](http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisD_who.cdscsrncs2001_1.pdf) (30-6-2010)
10. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen (2004)
11. Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (2009). Bekanntmachung der Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten
12. Public Health Agency of Canada. www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds78e-eng.php (30-6-10)
13. Belgian Biosafety Server www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_virus.pdf(14-06-10)