

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 07 maart 2024
KENMERK CGM/240307-01
ONDERWERP Advies huisvesting muizen met AAV-geïnfecteerde embryo's en pups

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende dossier IG 24-016_2.8-000 getiteld 'Generation of transgenic mice using AAV-vectors', ingediend door het Academisch Ziekenhuis Leiden (LUMC), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

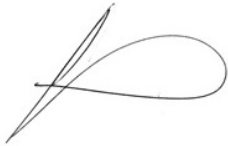
De COGEM is gevraagd te adviseren over de huisvesting van muizen met transgene embryo's en de hieruit geboren transgene pups. Voor het verkrijgen van de transgene muizen wordt een bevruchte eicel geïnfecteerd met genetisch gemodificeerde (gg-)AAV vectoren die een donorsequentie bij zich dragen. Met behulp van CRISPR-Cas9 wordt de donorsequentie in het genoom van de muis ingebouwd. Voorafgaand aan implantatie in de moedermuizen, worden de embryo's veelvuldig gewassen om resterende gg-AAV deeltjes te verwijderen. De aanvrager verzoekt om de moedermuizen met transgene embryo's en, na de geboorte, de transgene jongen (pups) op inperkingsniveau D-I te huisvesten.

AAV's zijn niet-ziekteverwekkende virussen die alleen kunnen vermenigvuldigen als in de geïnfecteerde cel een tweede infectie met een helpervirus plaatsvindt. In gg-AAV vectoren ontbreken alle AAV-genen, waardoor voor vermenigvuldiging ook nog een infectie met een wildtype AAV moet plaatsvinden.

Vanwege de verdunning van de gg-AAV deeltjes voorafgaand aan de implantatie, is de COGEM van oordeel dat de kans op uitscheiding van gg-AAV door de moedermuis verwaarloosbaar klein is. Het gg-AAV dat in het embryo aanwezig is, zal gedurende de ontwikkeling eveneens verdund worden. Er kan niet geheel uitgesloten worden dat integratie van het gg-AAV in het muizengenoom optreedt. Om hieruit gg-AAV deeltjes te verkrijgen, zouden de cellen van de transgene muis tegelijkertijd met een wildtype AAV en een helpervirus geïnfecteerd moeten worden. De kans hierop acht de COGEM verwaarloosbaar klein. Concluderend kan de COGEM instemmen met het verzoek om de dieren op D-I te huisvesten. Op dit inperkingsniveau zijn de risico's voor mens en milieu van de voorgenumen werkzaamheden verwaarloosbaar klein.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c.

- Drs. Y de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling zijn de COGEM leden dr. M.C.W. Feltkamp en prof. dr. R.C. Hoeben niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Huisvesting van muizen met AAV-geïnfecteerde embryo's en pups

COGEM advies CGM/240307-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een verzoek tot inschaling voor de huisvesting van moedermuizen met transgene embryo's en transgene pups verkregen door infectie met AAV-1 of -6 vectoren en electroporatie met 'Clustered regularly interspaced short palindromic repeats' (CRISPR) 'associated protein 9' (CRISPR-CAS9) ribonucleoproteïnes (RNP's, bestaande uit het Cas9-eiwit in combinatie met een zogenaamd gids RNA sgRNA). Het betreft een nieuwe methode om transgene dieren te ontwikkelen. Op basis van de Regeling GGO bijlage 5 zou huisvesting van deze dieren plaats moeten vinden op DM-I.¹ De aanvrager verzoekt echter de dieren op inperkingsniveau D-I te huisvesten. De aanvraag is afkomstig van het LUMC (IG 24-016). De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met het verzoek en of de betreffende dieren gg-AAV kunnen uitscheiden, al dan niet na invasieve handelingen.

2. Adeno-associated virus (AAV)-vectoren

Adeno-associated virussen (AAV's) behoren tot de familie van de *Parvoviridae*, subfamilie *Parvovirinae* en het genus *Dependoparvovirus*. Er bestaan verschillende AAV serotypes die aan de hand van een letter-/cijfercode worden weergegeven (zoals AAV-1, AAV-2, AAV-6).

AAV's zijn enkelstrengs DNA-virussen met een genoom van circa 5 kilobasen (kb) dat omhuld wordt door een eiwitmantel (capside).² In het genoom bevinden zich twee genen: *rep* en *cap/AAP* die geflankeerd worden door twee 'inverted terminal repeats' (ITR's). Het *rep* (replicatie) gen codeert voor vier replicase-eiwitten (Rep78, Rep68, Rep52 en Rep40) 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* (capside) gen codeert voor drie manteleiwitten (VP1, VP2 en VP3), die de virusmantel vormen.² De ITR's fungeren als start van de DNA-replicatie en als het 'packaging' signaal (inpakken van het virale genoom in de capsid-eiwitten).

Voor replicatie zijn AAV's afhankelijk van een helpervirus, zoals adenovirussen.^{3,4,5} Bij afwezigheid van een helpervirus zal het virale genoom niet repliceren, en ontstaat er een persistente 'infectie' waarbij het AAV genoom latent intra- of extrachromosomaal (episomaal) in de celkern aanwezig blijft.^{3,6}

Bij vectoren die afgeleid zijn van AAV worden de *rep* en *cap/AAP* genen van AAV verwijderd en vervangen door een transgene expressiecassette die tussen de ITR's wordt geplaatst. Tijdens de productie van de AAV-vector worden de *rep* en *cap/AAP* genen van AAV *in trans* aangeboden en wordt het vectorgenoom ingepakt in de *in trans* tot expressie gebrachte capsid-eiwitten.

3. Voorgenomen werkzaamheden

Bij de voorgenomen werkzaamheden wordt een nieuwe methode beschreven om transgene muizen te genereren. Hiervoor wordt een bevruchte eicel uit een donormuis tijdens het ééncellig stadium (ook

wel zygote) geïnfecteerd met AAV-vectoren en zullen vervolgens CRISPR-CAS9 RNP's met behulp van electroporatie de cel in gebracht worden. Er wordt gebruik gemaakt van AAV-vectoren die verkregen zijn van derden of die eerder geproduceerd zijn onder een andere vergunning. Voor de productie wordt gebruik gemaakt van de *rep/cap* genen van AAV-1 en AAV-6 om het vectorgenoom in te pakken. De ITR's zijn afkomstig van AAV-2. Er zullen 'homology-directed repair' (HDR) templates gebruikt worden als donorsequenties die gebaseerd zijn op gekarakteriseerde genen van zoogdieren en waarmee genetisch gemodificeerde dieren vervaardigd kunnen worden.

Om de transgene muizen te genereren worden zygotes verkregen uit donormuizen eerst *in vitro* geïnfecteerd met AAV2/1 of AAV2/6 vectoren waarin de HDR-template is gekloneerd. Na vijf uur en drie wasstappen worden de zygotes geëlectroporeerd met Cas9/sgRNA RNP's om de donorsequenties te integreren in het genoom van de muis. Hierna worden de zygotes één dag gekweekt en nogmaals drie keer gewassen. Na de overnachtkweek zullen de embryo's zich in een tweecellig stadium bevinden en worden deze geïmplant in een schijnzwangere 'foster'-muis. Na ongeveer 20 dagen (ca. 3 weken) zullen de transgene pups geboren worden. Verzocht wordt om de 'foster'-moeder na implantatie van de gg-embryo's en de geboren transgene pups op een D-I diervverblijf te huisvesten. De aanvrager stelt hierbij zelf als voorwaarde dat met verdunning en wasstappen tijdens de vervaardiging van de tweecellige embryo's, het aantal AAV-deeltjes dat bij de implementatie meegenomen wordt <1 zal zijn.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2018 geadviseerd om alle AAV's vallend onder de soortnamen Adeno-associated dependoparvovirus A (tegenwoordig *Dependoparvovirus primate1*) en Adeno-associated dependoparvovirus B (tegenwoordig *Dependoparvovirus mammalian1*), als niet-ziekteverwekkend in te delen in de laagste pathogeniteitsklasse (pathogeniteitsklasse 1).⁷

Voorafgaand aan de herziening van de pathogeniteitsklasse heeft de COGEM verscheidene keren geadviseerd over omlaagschaling van werkzaamheden waarbij proefdieren geïnfecteerd zijn met AAV, naar D-I. In het meeste recente advies uit 2016 stelt de COGEM dat muizen die geïnjecteerd worden met gg-AAV afgeleid van serotype 1, 2, 5 en 6 na 7 dagen op D-I gehuisvest kunnen worden indien de toegediende dosering maximaal 1×10^9 deeltjes betreft.^{8,9} Dit is gebaseerd op gegevens over de halfwaardetijd van deze AAV-serotypen.

5. Overweging en advies

De aanvrager verzoekt een omlaagschaling om 'foster' muizen die transgene (met gg-AAV geïnfecteerde) pups bij zich dragen, en de transgene pups na de geboorte op inperkingsniveau D-I te huisvesten. Omdat de transgene pups vervaardigd zijn met een virale vector dient volgens de Regeling ggo de huisvesting op een DM-I verblijf plaats te vinden. De aanvrager beargumenteert dat huisvesting op D-I gerechtvaardigd is, omdat er bij de implantatie van het gg-embryo geen vrije AAV-vectordeeltjes aanwezig zullen zijn, en dat gezien de ontwikkelingstijd van de pups en de halfwaardetijd van de AAV-vectoren, er geen risico is op aanwezigheid van gg-AAV na de geboorte van de transgene pups.

Het Bureau ggo heeft in een voorstel tot inschaling op inperkingsniveau D-I enkele voorwaarden genoemd:

- Voor de productie van genetisch gemodificeerd AAV is gebruik gemaakt van serotype(n) 1 en 6;
- Het AAV productiesysteem en de dieren zijn vrij van wildtype AAV, wildtype adenovirus en andere virussen die in een helperfunctie van AAV kunnen voorzien;
- Voor infectie van de 1-cel embryo's worden maximaal $2,5 \times 10^{11}$ genoomkopieën gebruikt;
- Een reductie van het aantal vrije vectordeeltjes wordt gerealiseerd conform het protocol zoals beschreven in de aanvraag alvorens huisvesting op D-I plaats kan vinden.

De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met het verzoek tot omlaagschaling, en of de 'foster'-moeders na implantatie, of de gg-nakomelingen, al dan niet tijdens invasieve handelingen gg-AAV kunnen uitscheiden. In onderstaande paragrafen zal de COGEM ingaan op deze aspecten.

5.1 Reductie van AAV-vectoren

Voor de infectie van de zygoten zal een maximale titer van $2,5 \times 10^{11}$ genoomkopieën (GC) toegediend worden. Door een combinatie van wasstappen en verdunningen wordt volgens de aanvrager een verdunningsfactor van 250.000x bereikt na de overnachtkweek. Voorafgaand aan implantatie zullen de gg-embryo's vervolgens nog driemaal gewassen worden met een verdunningsfactor van 100x. Op basis hiervan stelt de aanvrager dat bij de implantatie van het tweecellige embryo's in de 'foster'-moeder, het aantal vrij aanwezige AAV-deeltjes minder dan 1 zal zijn. De COGEM merkt op dat het door de aanvrager gehanteerde protocol onvoldoende inzichtelijk en navolgbaar is en dat daardoor niet duidelijk is hoe de gestelde verdunningsfactor van 250.000x bereikt wordt. Uitgaande van deze verdunningsfactor na de overnachtkweek en rekening houdend met de drie wasstappen die hierna plaatsvinden (driemaal een verdunning van 100x), zou een verdunningsfactor van $2,5 \times 10^{11}$ bereikt worden. Dit zou gelijk zijn aan de aanwezigheid van 1 vrij AAV-vectordeeltje in het kweekvolume van het gg-embryo. De aanvrager stelt dat niet het hele kweekvolume zal worden gebruikt. Het is echter onduidelijk welk volume gebruikt zal worden. Een eventueel aanwezig vectordeeltje zal na de implantatie in de 'foster'-muis mogelijk éénmalig een cel infecteren of door natuurlijk verval afgebroken worden. Het mogelijke risico op uitscheiding van gg-AAV door de 'foster'-muis door aanwezigheid van één vectordeeltje tijdens de implantatie is verwaarloosbaar klein. De COGEM is van oordeel dat daarmee ook het mogelijke risico op blootstelling aan gg-AAV tijdens invasieve handelingen met de 'foster'-dieren na implantatie, verwaarloosbaar klein is.

5.2 Kans op uitscheiding door mobilisatie van gg-AAV

Infectie van gg-AAV vindt plaats tijdens het ééncellige stadium na de bevruchting. Vanwege de afwezigheid van het *rep*-gen zal het gg-AAV na infectie voornamelijk als extrachromosomaal (episomaal) DNA element in de cel aanwezig zijn. De gg-pups zullen ongeveer 20 dagen (ca. 3 weken) na implantatie geboren worden. Bij de celdeling die gedurende de ontwikkeling van het embryo plaatsvindt, zal de aanwezigheid van het episomale gg-AAV sterk verdund worden. Vanwege het replicatiedeficiënte karakter van de AAV-vectoren, is de kans op uitscheiding van gg-AAV deeltjes door de transgene pups na de geboorte verwaarloosbaar klein.

In de wetenschappelijke literatuur wordt echter beschreven dat in sommige gevallen het gg-AAV kan integreren in het genoom van de gastheer, bijvoorbeeld wanneer dubbelstrengs breuken optreden in het DNA en actieve reparatie van het DNA plaatsvindt.^{10,11} Omdat in de onderhavige aanvraag de infectie met gg-AAV opgevolgd wordt door electroporatie met Cas9/sgRNA RNP's, is de COGEM van oordeel dat niet uitgesloten kan worden dat gehele of gedeeltelijke AAV-vectorsequenties integreren op de locatie waar de breuk plaatsvindt.¹² Om het geïntegreerde vectorgenoom opnieuw te mobiliseren, is superinfectie met zowel een wildtype AAV en een helpervirus noodzakelijk. Laboratorium-muizen zijn geen natuurlijke gastheer voor de virussen waarop AAV-vectoren zijn gebaseerd.^{13,14} De COGEM acht de kans dat er in de transgene muis mobilisatie (i.e., vorming van een nieuw infectieus virusdeeltje) door superinfectie met een wildtype AAV en een helpervirus optreedt, verwaarloosbaar klein, mede gezien de gestelde voorwaarde dat de dieren en het AAV-productiesysteem vrij zijn van wildtype AAV, wildtype adenovirus en andere virussen die in een helperfunctie van AAV kunnen voorzien. Hierbij is ook het mogelijke risico op blootstelling aan infectieuze AAV-vectordeeltjes tijdens invasieve handelingen met de transgene nakomelingen, verwaarloosbaar klein.

5.3 Conclusie

De COGEM stemt in met het verzoek om de 'foster'-moeders en transgene pups op D-I te huisvesten. Zij kan hierbij instemmen met de door BGGO gestelde aanvullende voorwaarden, maar merkt op dat het aanvullende voorschrift van BGGO "*Een reductie van het aantal vrije vectordeeltjes wordt gerealiseerd conform het protocol zoals beschreven in de aanvraag alvorens huisvesting op D-I plaats kan vinden*", gezien de onduidelijkheid van het gebruikte protocol weinig toegevoegde waarde heeft. Zij adviseert deze voorwaarde aan te passen om te komen tot een reductie waarbij minder dan 1 vrij vectordeeltje aanwezig zal zijn bij de implantatie – eender aan de voorgestelde voorwaarde in de aanvraag –, of de aanvrager een navolgbaar protocol te laten overleggen waaruit de genoemde reductie blijkt. De COGEM is van oordeel dat op het genoemde inperkingsniveau de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. Bijlage 5 <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2024-01-01#Bijlage5> (bezocht: 26 februari 2024)
2. Tijssen P *et al.* (2012). Family *Parvoviridae*. In: Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
3. Berns KI & Parrish CR (2013). *Parvoviridae*. In: Fields virology, volume 2, 6th edition. Edited by Knipe DM en Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
4. Cotmore SF *et al.* (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Parvoviridae*. J. Gen. Virol. 100: 367–368
5. Zinn E & Vandenberghe LH (2014). Adeno-associated virus: Fit to serve. Curr Opin Virol. 0: 90–97
6. Salganik M *et al.* (2015). Adeno-associated Virus as a Mammalian DNA Vector. Microbiol. Spectr. 3: doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0052-2014

7. COGEM (2018). *Adeno-associated dependoparvovirus A* en *Adeno-associated dependoparvovirus B* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. COGEM advies CGM/180321-01
8. COGEM (2016). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde AAV-geïnfecteerde muizen en ratten. COGEM advies CGM/161108-01
9. COGEM (2012). Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd AAV in muizen. COGEM advies CGM/121122-02
10. Miller DG *et al.* (2004). Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. *Nat. Genet.* 36: 767–773
11. Sabatino DE *et al.* (2022). Evaluating the state of the science for adeno-associated virus integration: An integrated perspective. *Mol. Ther.* 30: 2646-2663
12. Hanlon KS *et al.* (2019). High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat. Commun.* 10: 4439
13. Herzog RW *et al.* (2011). AAV Vector Biology in Primates: Finding the Missing Link? *Mol. Ther.* 19: 1923-1924
14. Herzog RW *et al.* (2007). Immune responses to AAV capsid: are mice not humans after all? *Mol. Ther.* 15: 649-650