

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw W.J. Mansveld  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 24 augustus 2015  
**KENMERK** CGM/150824-01  
**ONDERWERP** Advies werkzaamheden met een gg-AAV vector coderend voor  
alpha-synucleïne

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag met de titel: *'The effects of mitochondrial targeting of alpha synuclein over-expression in the Substantia Nigra and dietary intervention on progression of Neuroinflammation, dopaminergic neuron loss, brain metabolism and motor behaviour in rats'* van het Universitair Medisch Centrum Groningen, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) AAV deeltjes die coderen voor  $\alpha$ -synucleïne. De aanvrager wil deze replicatiedeficiente gg-AAV deeltjes onder andere gebruiken om de invloed van voeding op het hersenmetabolisme en het motorisch gedrag van ratten te onderzoeken na overexpressie van  $\alpha$ -synucleïne in de hersenen. Daarnaast is de COGEM gevraagd te adviseren over handelingen met muizen die transgeen zijn voor  $\alpha$ -synucleïne en werkzaamheden met weefsels en cellen van deze gg-dieren.

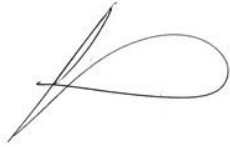
Het  $\alpha$ -synucleïne is een eiwit dat betrokken is bij de signaaloverdracht tussen zenuwen in gewervelde dieren. Het eiwit kan complexen vormen. Dit wordt in verband gebracht met het ontstaan van neurodegeneratieve ziekten. De COGEM is van mening dat de wetenschappelijke kennis op dit moment onvoldoende is om met zekerheid uitspraken te doen over de natuurlijke overdraagbaarheid. Zij beschouwt  $\alpha$ -synucleïne derhalve op basis van het voorzichtigheidsprincipe vooralsnog als schadelijke genproduct totdat wetenschappelijke onderzoek meer duidelijkheid geeft over de aard van dit eiwit.

De COGEM adviseert om de werkzaamheden met gg-AAV deeltjes die  $\alpha$ -synucleïne tot expressie kunnen brengen in te schalen op ML-II inperkingsniveau, en *in vivo* werkzaamheden met ratten waaraan de gg-AAV deeltjes zijn toegediend op DM-II inperkingsniveau in te schalen.

De COGEM adviseert om de handelingen met gg-muizen en handelingen met weefsels en cellen van deze muizen op DM-II en ML-II uit te voeren met aanvullende voorschriften.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a final horizontal stroke.

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 IenM

# Werkzaamheden met een gg-AAV vector coderend voor $\alpha$ -synucleïne

## COGEM advies CGM/150824-01

### Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) AAV deeltjes die  $\alpha$ -synucleïne tot expressie brengen. De aanvrager geeft aan dat deze vectoren replicatiedeficiënt zijn. Het gen is achter een promoter geplaatst die volgens de aanvrager alleen actief is in neuronen. De aanvrager wil onder andere de invloed van voeding onderzoeken op het hersenmetabolisme en het motorisch gedrag van ratten na overexpressie van  $\alpha$ -synucleïne in de hersenen. Daarnaast is de COGEM gevraagd te adviseren over werkzaamheden met gg-AAV vectoren waarbij het wildtype  $\alpha$ -synucleïne onder de controle staat van een promoter die in andere cellen dan neuronen tot expressie komt. Tevens is de COGEM gevraagd om te adviseren over de inschaling van invasieve handelingen met gg-muizen die een wildtype of een mutant  $\alpha$ -synucleïne in hun genoom hebben en de handelingen met weefsels en cellen van deze gg-muizen.

### Adeno-associated virus

Adeno-associated virus (AAV) behoort tot de familie *Parvoviridae* en het genus *Dependovirus*.<sup>1</sup> Het is een enkelstrengs DNA virus met een genoom van circa 4,7 kb. Het genoom codeert voor twee genen, *rep* en *cap*. Het *rep* gen codeert voor eiwitten die een rol spelen bij de virusreplikatie, de expressie van de structurele eiwitten en de integratie van het virusgenoom in het genoom van de gastheer. Het *cap* gen codeert voor de structurele eiwitten die de virusmantel vormen. De *rep* en *cap* genen worden geflankeerd door twee 'inverted terminal repeats' (ITR's), die zijn betrokken bij DNA-replikatie en integratie van het DNA in een chromosoom van de gastheer. Voor replicatie van AAV is co-infectie van een helpervirus nodig, zoals een adenovirus of een herpesvirus.<sup>1,2,3</sup> Als er geen ander virus in de cel aanwezig is, blijft AAV latent in de celkern aanwezig, in afwachting van infectie door een helpervirus.

AAV kan verschillende warmbloedige dieren, inclusief de mens, infecteren.<sup>2</sup> Er zijn verschillende serotypen van AAV bekend die verschillen in gastheerspecificiteit en weefseltropisme.<sup>1,4</sup> Infecties met AAV komen wereldwijd en frequent voor (80% van de humane populatie is seropositief voor AAV2), maar gaan voor zover bekend niet gepaard met ziekteverschijnselen.<sup>5</sup> Overdracht van het virus vindt waarschijnlijk plaats via de respiratoire of gastro-intestinale route.<sup>2</sup>

### $\alpha$ -Synucleïne

$\alpha$ -Synucleïne is een lichaamseigen eiwit van 14 kD dat aanwezig is in de cellen van de hersenen van zoogdieren. De functie van  $\alpha$ -synucleïne is nog niet bekend. Er is gesuggereerd dat  $\alpha$ -synucleïne een rol speelt bij de regulatie van het vrijkomen van de neurotransmitter dopamine.<sup>6</sup>

Er zijn verschillende vormen van  $\alpha$ -synucleïne beschreven. De monomere vorm van  $\alpha$ -synucleïne komt voor in de cellen, maar wanneer deze eiwitten verkeerd vouwen kunnen ze

samenklonteren (aggregeren) en kunnen oligomere vormen en uiteindelijk fibrillen ontstaan. Tijdens dit proces aggregeren eerst een beperkt aantal eiwitten (oligomere vormen) en vormen een 'seed' waaraan meerdere van hetzelfde verkeerd gevouwen eiwit kan binden. Tijdens dit proces kan een keten gevormd worden waardoor uiteindelijk een fibril gevormd wordt.<sup>7</sup> Aggregatie van  $\alpha$ -synucleïne is geassocieerd met neurodegeneratieve ziekten als Lewy body dementie (LBD) en de ziekte van Parkinson. De oligomere vorm wordt in de wetenschappelijke literatuur gezien als de meest toxische vorm van  $\alpha$ -synucleïne en fibrillen worden soms ook als toxisch beschouwd.<sup>10</sup>

Zowel bij LBD als de ziekte van Parkinson is verkeerd gevouwen  $\alpha$ -synucleïne in geaggregeerde vorm in Lewy bodies in de hersencellen aanwezig.<sup>8</sup> Bij de ziekte van Parkinson zijn de Lewy bodies vooral aanwezig in de *substantia nigra* (zwarte kern), terwijl de Lewy bodies bij LBD ook in de hersenschors gevonden worden.<sup>9</sup> In de N-terminale regio van  $\alpha$ -synucleïne zijn zes verschillende mutaties beschreven die mogelijk betrokken zijn bij het ontstaan van de ziekte van Parkinson.<sup>10</sup>

Er zijn aanwijzingen dat bepaalde vormen van het  $\alpha$ -synucleïne zich kunnen verspreiden naar omliggende gebieden in de hersenen.<sup>11</sup> Daarnaast zijn er aanwijzingen dat verkeerd gevouwen  $\alpha$ -synucleïne moleculen van cel naar cel overgedragen kunnen worden in mensen. In Parkinsonpatiënten die foetale dopamine producerende cellen in het brein getransplanteerd kregen, waren er na elf tot zestien jaar Lewy bodies aanwezig in de getransplanteerde cellen.<sup>12</sup>

## **Voorgenomen werkzaamheden**

### *Beschrijving van de genetisch gemodificeerde AAV-deeltjes*

Voor het beschreven onderzoek zal de aanvrager gebruik maken van vier verschillende soorten replicatiedeficiënte gg-AAV deeltjes. Het gg-AAV genoom bevat de coderende sequentie voor het wildtype  $\alpha$ -synucleïne of eGFP, al dan niet in combinatie met een mitochondriale targeting sequentie (MTS). De expressie van  $\alpha$ -synucleïne of eGFP wordt gereguleerd door de humane synapsin-1 promotor. In de virale vector is volgens de aanvrager een element aanwezig dat de expressie van het wildtype  $\alpha$ -synucleïne tijdens de productie van de gg-AAV deeltjes voorkomt. De aanvrager heeft niet aangegeven welk element dit is. Daarnaast bevat de gg-AAV vector het *Woodchuck hepatitis virus* regulatory element die het transport van mRNA vanuit de celkern efficiënter laat verlopen.<sup>13</sup>

De gg-AAV deeltjes worden geproduceerd met behulp van een productiesysteem dat gebaseerd is op co-transfectie met twee plasmiden in HEK293 cellen. Voor de productie van gg-AAV deeltjes wordt het helperplasmide pDG2, dat codeert voor de *rep* en *cap* genen van AAV-2 en adeno-helperfuncties, getransfecteerd in combinatie met een plasmide dat het genoom van het gg-AAV bevat. De productie van de gg-AAV vindt elders plaats en valt niet onder deze vergunningaanvraag.

### *Handelingen met ratten in associatie met gg-AAV*

De gg-AAV deeltjes worden in een veiligheidskabinet van klasse 2 via een bilaterale canule in de hersenen toegediend aan ratten. In één hersenhelft worden gg-AAV deeltjes toegediend die het wildtype  $\alpha$ -synucleïne tot expressie brengen en als controle worden in de andere hersenhelft gg-

AAV deeltjes die eGFP tot expressie brengen, toegediend. De aanvrager wil de ratten injecteren met  $\alpha$ -synucleïne en eGFP of  $\alpha$ -synucleïne-MTS en eGFP-MTS. Na toediening wordt de canule afgesloten met een dopje. Het dopje wordt met lijm gefixeerd zodat er geen gg-AAV deeltjes uit de canule kunnen lekken. De ratten worden gedurende het hele experiment in individueel geventileerde kooien op DM-II inperkingsniveau gehouden.

Tijdens het experiment zullen 1, 2, 3, 5 en 8 weken na het toedienen van de gg-AAV deeltjes gedragstesten uitgevoerd worden. De aanvrager geeft aan dat deze testen zullen plaatsvinden in een DM-II laboratorium in een veiligheidskabinet van klasse 2. Daarnaast zullen op dezelfde tijdstippen ook scans van de hersenen van de ratten gemaakt worden met een microPET scanner. Voordat de scan plaatsvindt, worden de ratten in slaap gebracht in een veiligheidskabinet van klasse 2. De aanvrager geeft aan dat de scans zullen plaatsvinden in een DM-II laboratorium buiten het veiligheidskabinet van klasse 2.

#### *Handelingen met cellen en weefsels van getransduceerde ratten in associatie met genetisch gemodificeerde micro-organismen*

De ratten worden na afloop van het experiment gedood middels cardiale perfusie met een 4% paraformaldehyde oplossing. Deze werkzaamheden zullen plaatsvinden in een veiligheidskabinet van klasse 2. Vervolgens zullen de hersenen uitgeprepareerd worden en gedurende 24 uur gefixeerd in een 4% paraformaldehyde oplossing. Na fixatie worden de hersenen histologisch onderzocht.

### **Eerder COGEM advies**

#### *AAV vectoren*

De COGEM heeft in het verleden verschillende malen geadviseerd over klinische studies waarbij AAV vectoren gebruikt werden.<sup>14,15,16</sup> In 2002 en 2012 heeft de COGEM geadviseerd over de inschaling van *in vivo* laboratoriumwerkzaamheden met AAV deeltjes die geproduceerd werden met een productiesysteem dat gebaseerd was op co-transfectie van twee plasmiden.<sup>17,18</sup> Dit systeem berust op een helperplasmide dat codeert voor de *rep* en *cap* genen alsmede de adenovirusfuncties benodigd voor het maken van het gg-AAV en een plasmide met de genetische informatie van het gg-AAV deeltje. Dit plasmide bevatte alleen de ITRs en de beoogde transgenen. Vanwege het gebruikte productiesysteem achtte de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat bij productie van de gg-AAV deeltjes recombinatie tussen de plasmiden op zou treden. Aanvullende maatregelen zijn geadviseerd om het risico op contaminatie met wildtype adeno- of herpesvirus te verkleinen. De COGEM achtte de kans daarom verwaarloosbaar klein dat met het genoemde productiesysteem replicatiecompetent AAV zou ontstaan.

#### *Werkzaamheden met $\alpha$ -synucleïne*

Eerder dit jaar heeft de COGEM een advies uitgebracht over werkzaamheden met wildtype en mutant  $\alpha$ -synucleïne.<sup>19</sup> In dit advies heeft zij gesteld dat gezien de ernst van de ziekte van Parkinson en het feit dat nog veel onbekend is over de mogelijke transmissie van  $\alpha$ -synucleïne pathologie de COGEM op basis van het voorzichtigheidsprincipe  $\alpha$ -synucleïne voorlopig

beschouwt als schadelijk genproduct, totdat zij op basis van nieuwe wetenschappelijke informatie de aard van dit eiwit nader kan bepalen.

Zodoende zijn de werkzaamheden met dit eiwit ingeschaald op ML-II en DM-II inperkingsniveau. Waarbij de volgende aanvullende maatregelen noodzakelijk geacht worden:

- Open handelingen dienen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet klasse 2;
- Tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
- Het gebruik van ‘sharps’ moet tot een minimum worden beperkt en is alleen toegestaan in combinatie met kevlarhandschoenen.

Omdat niet duidelijk is welke inactivatiemethode geschikt is om  $\alpha$ -synucleïne na afloop van de experimenten te inactiveren, heeft de COGEM geadviseerd om voor decontaminatie de volgende voorschriften te hanteren:

- Het vaste afval en kleine volumina vloeibaar afval dient in breukvaste en lekdichte containers verzameld en als ziekenhuisafval door verbranding vernietigd te worden;
- Gezien het ontbreken van ervaring met de inactiverende werking van 8M ureum oplossing op werkoppervlakken, dienen de werkplekken voorzien te worden van absorberend materiaal dat als ziekenhuisafval verbrand wordt;
- Vloeibaar afval dient gedurende een uur te worden geïncubeerd in een 8M ureum oplossing (eindconcentratie), gevolgd door minimale verhitting bij 121°C gedurende 30 minuten.

### **Adviesvraag**

De aanvrager is voornemens om experimenten uit te voeren met replicatiedefectieve gg-AAV deeltjes die coderen voor  $\alpha$ -synucleïne. In het gg-AAV genoom staat de expressie van  $\alpha$ -synucleïne onder controle van de humane synapsin-1 promotor. De aanvrager is voornemens om de gg-AAV deeltjes toe te dienen in de hersenen van ratten. Vervolgens worden gedragstesten uitgevoerd. Daarnaast worden scans gemaakt van de hersenen van de ratten en aan het einde van het experiment worden de ratten gedood. De hersenen worden gefixeerd en gebruikt voor histologische kleuringen. De COGEM is gevraagd te adviseren over deze handelingen.

Behalve de inschaling van de bovengenoemde werkzaamheden is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van soortgelijke experimenten waarbij een andere promotor gebruikt wordt. Hierdoor kan er expressie van het  $\alpha$ -synucleïne in andere weefsels plaatsvinden. Daarnaast is de COGEM gevraagd op welk inperkingsniveau invasieve handelingen met transgene muizen, en cellen en weefsels van deze muizen ingeschaald moeten worden.

### **Overweging**

#### *$\alpha$ -synucleïne*

Van nature is  $\alpha$ -synucleïne aanwezig in de hersenen van gewervelde dieren. Het eiwit kan onder specifieke condities aggregeren en er bestaan sterke aanwijzingen dat deze aggregatie leidt tot het ontstaan van de ziekte van Parkinson.<sup>10</sup> De exacte rol van  $\alpha$ -synucleïne aggregaten in het ontstaan

van de ziekte van Parkinson is echter nog niet opgehelderd. Daarnaast is op dit moment niet duidelijk welke condities noodzakelijk zijn voor de aggregatie van  $\alpha$ -synucleïne en is er onduidelijkheid over de mogelijke transmissieroutes. Verschillende *in vivo* experimenten suggereren dat  $\alpha$ -synucleïne pathologie van dier-op-dier en van mens-op-dier overdraagbaar is.<sup>20,21</sup> Gezien de ernst van de ziekte van Parkinson en het feit dat nog veel onbekend is over de mogelijke transmissie van  $\alpha$ -synucleïne pathologie beschouwt de COGEM op basis van het voorzichtigheidsprincipe  $\alpha$ -synucleïne voorlopig als schadelijk genproduct, totdat zij op basis van nieuwe wetenschappelijke informatie de aard van dit eiwit nader kan bepalen.

#### *Productie van gg-AAV deeltjes die coderen voor $\alpha$ -synucleïne*

De aanvrager geeft aan dat de virusdeeltjes die gebruikt worden in de experimenten elders geproduceerd zijn. De replicatiedefectieve gg-AAV deeltjes zijn geproduceerd in afwezigheid van wildtype AAV, wildtype adenovirus en andere virussen die in een helperfunctie van AAV kunnen voorzien. Op basis van de afwezigheid van sequentieoverlap tussen de verschillende plasmiden en de langdurige ervaring met het beschreven productiesysteem concludeert de COGEM dat de kans verwaarloosbaar klein is dat tijdens de productie replicatiecompetent gg-AAV zal ontstaan.<sup>18</sup> Zij wijst daarbij op het belang dat de productiecellen vrij zijn van wildtype AAV en helpervirussen.

De aanvrager stelt dat tijdens de productie van de gg-AAV deeltjes geen  $\alpha$ -synucleïne geproduceerd wordt. De transcriptie van  $\alpha$ -synucleïne wordt gereguleerd door de humane synapsin-1 promoter die volgens de aanvrager alleen actief is in neuronale cellen. Daarnaast bevat het gg-AAV genoom volgens de aanvrager een element dat de transcriptie van  $\alpha$ -synucleïne voorkomt.

De productie van gg-AAV deeltjes vindt plaats in HEK293 cellen. Deze cellen zijn afgeleid van humane embryonale niercellen. Ondanks deze oorsprong zijn in de wetenschappelijke literatuur aanwijzingen dat de HEK293 cellen verschillende neuronale eiwitten tot expressie brengen.<sup>22</sup> Mogelijk zijn in dit celtype promotoren actief die normaal alleen in neuronen actief zijn. Verder bevat het gg-AAV genoom volgens de aanvrager een element dat transcriptie van  $\alpha$ -synucleïne moet voorkomen, maar het is onduidelijk welk element dit is.

Op basis van deze informatie is de COGEM van mening dat tijdens de productie van gg-AAV deeltjes mogelijk ook  $\alpha$ -synucleïne geproduceerd wordt en dat  $\alpha$ -nucleïne mogelijk aanwezig is in de gg-AAV batches.

#### *Blootstelling van de medewerker aan $\alpha$ -synucleïne*

Er zijn verschillende momenten tijdens de werkzaamheden dat de medewerker blootgesteld kan worden aan  $\alpha$ -synucleïne. Na de productie van de gg-AAV deeltjes vinden nog enkele zuiveringsstappen plaats voordat het aan ratten wordt toegediend. Aangezien de werkzaamheden met de gg-AAV deeltjes worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet van klasse 2 is de enige manier waarop de medewerker direct aan  $\alpha$ -synucleïne blootgesteld wordt via een prik- of snijaccident. Aanvullende voorschriften zijn noodzakelijk om de veiligheid van de laboratoriummedewerker te garanderen.

Daarnaast kan de medewerker aan het einde van het experiment aan  $\alpha$ -synucleïne worden blootgesteld. De ratten worden gedood en gefixeerd middels cardiale perfusie met 4% paraformaldehyde fixatief. Hierna zullen de hersenen uitgeprepareerd worden en 24 uur in een 4% paraformaldehyde oplossing worden opgeslagen voordat ze gebruikt worden voor histologische kleuringen. Tijdens het experiment wordt in de rattenhersenen  $\alpha$ -synucleïne geproduceerd. Gerapporteerd is dat de fixatie met formaldehyde niet voldoende is om aggregaten van  $\alpha$ -synucleïne te fixeren.<sup>23</sup> Gezien het risico op blootstelling van de medewerker aan  $\alpha$ -synucleïne of  $\alpha$ -synucleïne aggregaten door spatten of aerosolen, adviseert de COGEM om de histologische kleuringen in een veiligheidskabinet van klasse 2 op ML-II inperkingsniveau uit te voeren om mogelijke blootstelling aan  $\alpha$ -synucleïne te voorkomen.

#### *Werkzaamheden met de gg-AAV deeltjes die coderen voor $\alpha$ -synucleïne*

Wildtype AAV kan niet autonoom repliceren in een gastheercel, daarvoor is de aanwezigheid van een helpervirus, zoals adenovirus of herpesvirus nodig. De COGEM is daarom van mening dat AAV bij afwezigheid van een helpervirus van nature biologisch ingeperkt is.

#### *Blootstelling van medewerker aan gg-AAV*

Tijdens de werkzaamheden worden de gg-AAV deeltjes toegediend in de hersenen van ratten. De transmissie van wildtype AAV vindt plaats via de aerogene en gastro-intestinale route. Aangezien de replicatiedeficiente gg-AAV deeltjes in de hersenen toegediend worden en de COGEM de kans zeer klein acht dat gg-AAV deeltjes de bloed-hersenbarrière passeren, is de COGEM van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat gg-AAV deeltjes verspreid worden.

Daarnaast kan de medewerker aan gg-AAV deeltjes blootgesteld worden via een prikaccident tijdens het toedienen van gg-AAV aan de ratten. Omdat de gg-AAV deeltjes replicatiedefectief zijn, moeten er voordat replicatie van de gg-AAV vector in de medewerker kan plaatsvinden cellen zowel door een gg-AAV, een wildtype AAV als een helpervirus geïnfecteerd zijn. De COGEM acht de kans klein dat de betreffende medewerker op hetzelfde moment geïnfecteerd is door zowel een wildtype AAV als een helpervirus en diezelfde cellen ook geïnfecteerd worden door het gg-AAV. Om het risico op verspreiding van gg-AAV verder te verkleinen acht de COGEM aanvullende voorschriften noodzakelijk.

Een andere mogelijke route van blootstelling zou aan het einde van het experiment zijn. De COGEM acht de kans echter zeer klein dat er 1 week na het toedienen van maximaal  $1 \times 10^9$  replicatiedeficiënte gg-AAV deeltjes in de hersenen er nog gg-AAV aanwezig is. Mocht er aan het einde van het experiment alsnog gg-AAV aanwezig zijn, dan is de beschreven fixatiemethode voldoende om deze deeltjes te inactiveren.

#### *Werkzaamheden met ratten buiten het veiligheidskabinet van klasse 2*

De aanvrager verzoekt de ratten 7 dagen na toediening van de gg-AAV deeltjes op het DM-II laboratorium buiten het veiligheidskabinet te mogen brengen om hersenscans te kunnen maken. De ratten worden na toediening van de gg-AAV deeltjes gehouden in een DM-II laboratorium. Het is onbekend hoeveel gg-AAV deeltjes de aanvrager wil toedienen aan de ratten.

In een eerder advies heeft de COGEM geadviseerd dat muizen 7 dagen na toediening van gg-AAV deeltjes in het oog, van DM-II inperkingsniveau teruggeplaatst mochten worden naar D-I inperkingsniveau, omdat aangetoond was dat er niet langer gg-AAV deeltjes aanwezig waren in het bloed en de urine van de muizen. Een voorwaarde voor deze omlaagschaling was dat er maximaal  $1 \times 10^9$  gg-AAV deeltjes toegediend werden.<sup>18</sup> De COGEM is van mening, dat het waarschijnlijk is dat afbraak van de gg-AAV deeltjes sneller zal verlopen in de hersenen dan in het oog.

De COGEM is van mening dat indien maximaal  $1 \times 10^9$  gg-AAV deeltjes in de hersenen van ratten is toegediend, het vanaf 7 dagen na toediening mogelijk is om de ratten buiten een veiligheidskabinet van klasse 2 te scannen zonder dat er een risico is voor mens en milieu.

*Werkzaamheden met weefsels en cellen van ratten waarbij gg-AAV met  $\alpha$ -synucleïne toegediend is*  
Aan het einde van het experiment worden de ratten gedood en gefixeerd middels cardiale perfusie met 4% paraformaldehyde fixatief. Hierna zullen de hersenen uitgeprepareerd worden en 24 uur in een 4% paraformaldehyde oplossing worden opgeslagen voordat ze gebruikt worden voor histologische kleuringen.

De COGEM acht de kans zeer klein dat er 1 week na het toedienen van  $1 \times 10^9$  replicatiedeficiënte gg-AAV deeltjes in de hersenen er nog gg-AAV aanwezig is. Mocht er aan het einde van het experiment alsnog gg-AAV aanwezig zijn, dan is de beschreven fixatiemethode voldoende om deze deeltjes te inactiveren. Tijdens het experiment wordt in de rattenhersenen  $\alpha$ -synucleïne geproduceerd. Gerapporteerd is dat de fixatie met formaldehyde niet voldoende is om aggregaten van  $\alpha$ -synucleïne te fixeren.<sup>23</sup> Gezien het risico op blootstelling van de medewerker aan  $\alpha$ -synucleïne of  $\alpha$ -synucleïne aggregaten door spatten of aerosolen, adviseert de COGEM om de histologische kleuringen in een veiligheidskabinet van klasse 2 op ML-II inperkingsniveau uit te voeren om mogelijke blootstelling van de medewerker aan  $\alpha$ -synucleïne te voorkomen.

#### *Additionele vragen van het Bureau ggo*

##### *Werkzaamheden met gg-AAV deeltjes met andere promotoren*

In de experimenten in deze aanvraag wordt gebruik gemaakt van replicatiedefectieve gg-AAV deeltjes die coderen voor het  $\alpha$ -synucleïne wanneer de human synapsin-1 promoter actief is. Deze promoter zorgt voor neuronale expressie van het eiwit na toediening in de hersenen van ratten. De COGEM is gevraagd te adviseren over soortgelijke werkzaamheden waarbij gebruik gemaakt wordt van een andere promoter. Zo is de CMV promoter ook actief in gliacellen. Aangezien er in de experimenten gebruik gemaakt wordt van replicatiedefectieve gg-AAV deeltjes die geproduceerd zijn in afwezigheid van helpervirussen, kunnen in ratten geen nieuwe gg-AAV deeltjes geproduceerd worden. Een voorwaarde hiervoor is dat de rat vrij moet zijn van wildtype AAV en helpervirussen.

Indien in de rat geen AAV en geen helpervirussen zoals adenovirussen en herpesvirussen aanwezig zijn, kan er geen replicatie van het gg-AAV kan optreden. De COGEM is van mening dat wanneer de productie van  $\alpha$ -synucleïne onder controle staat van een andere promoter dan de

humane synapsin-1 promoter er geen aanvullend milieurisico is ten opzichte van werkzaamheden met gg-AAV deeltjes met de humane synapsin-1 promoter.

*Invasieve handelingen van transgene muizen, en handelingen met cellen en weefsels van deze muizen*

In een eerder advies heeft de COGEM geadviseerd over de huisvestingen van muizen die transgeen zijn voor wildtype of mutant  $\alpha$ -synucleïne, en de huisvesting na het toedienen van 'seeds'.<sup>19</sup> De COGEM is in het onderhavige advies gevraagd te adviseren over het inperkingsniveau van invasieve handelingen met deze muizen en handelingen met cellen en weefsels van deze transgene muizen.

Zoals beschreven in het eerdere advies kan de COGEM niet uitsluiten dat de 'seeds' onbedoeld vrijkomen. De kans op blootstelling van de medewerker aan  $\alpha$ -synucleïne of  $\alpha$ -synucleïne aggregaten is hierdoor aanwezig. Om het risico op blootstelling te minimaliseren is de COGEM van mening dat er aanvullende voorschriften noodzakelijk zijn.

De COGEM is van mening dat het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein is wanneer het toedienen van 'seeds' aan de gg-muizen onder dezelfde voorwaarden worden uitgevoerd als het toedienen van de gg-AAV deeltjes aan ratten. Tevens acht de COGEM het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein wanneer de werkzaamheden met de weefsels en cellen, mits op dezelfde manier gefixeerd, op hetzelfde inperkingsniveau en met dezelfde aanvullende voorschriften uitgevoerd worden als de werkzaamheden met weefsels en cellen van de ratten.

## **Conclusie**

*Voorbereidende werkzaamheden met de gg-AAV deeltjes*

De aanvrager is voornemens om replicatiedefectieve gg-AAV deeltjes die het wildtype  $\alpha$ -synucleïne tot expressie brengen toe te dienen in de hersenen van ratten. De productie van de gg-AAV deeltjes die tijdens deze werkzaamheden gebruikt worden, valt niet onder deze vergunningaanvraag. De aanvrager meldt dat het productiesysteem vrij is van wildtype AAV en helpervirussen. Uitgaande van deze gegevens is er geen replicatiecompetent gg-AAV aanwezig in de te gebruiken virusbatches. De COGEM concludeert hieruit dat er tijdens de werkzaamheden geen replicatiecompetent gg-AAV aanwezig is. De COGEM adviseert de voorbereidende werkzaamheden op ML-II uit te voeren en de daarbij geldende standaardvoorschriften te hanteren. Vanwege de verspreidingsroutes van gg-AAV, adviseert de COGEM hierbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

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

*Toedienen van gg-AAV deeltjes die coderen voor  $\alpha$ -synucleïne aan ratten*

Tijdens deze werkzaamheden wordt gewerkt met gg-AAV deeltjes die aerogeen kunnen verspreiden. Omdat de oplossing waarin de gg-AAV deeltjes aanwezig zijn mogelijk  $\alpha$ -synucleïne bevat, acht de COGEM aanvullende maatregelen noodzakelijk om de werknemer te beschermen

tegen mogelijke prikaccidenten en blootstelling aan dit eiwit. De COGEM adviseert de werkzaamheden met gg-AAV in associatie met ratten uit te voeren op DM-II inperkingsniveau en hierbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- Tijdens de werkzaamheden dienen handschoenen te worden gedragen;
- De ratten moeten vrij zijn van wildtype AAV, wildtype adenovirus en andere virussen die in een helperfunctie van AAV kunnen voorzien;
- Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt, en is alleen toegestaan onder condities waarbij prik/snij-accidenten worden voorkomen (bv kevlar handschoenen);
- Open handelingen, waaronder alle handelingen waarbij een 'besmette' filtertopkooi geopend wordt, worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd.

#### *Imaging van ratten buiten het veiligheidskabinet van klasse 2*

De aanvrager is voornemens om de ratten vanaf 1 week na toediening van de gg-AAV deeltjes na verdoving te scannen in een microPET scanner in een DM-II verblijf. De COGEM acht de risico's verwaarloosbaar klein mits er maximaal  $1 \times 10^9$  virusdeeltjes toegediend zijn, en:

- Tijdens de werkzaamheden dienen handschoenen te worden gedragen;
- De gg-AAV deeltjes worden toegediend in de hersenen;
- Na toediening van de gg-AAV deeltjes worden de dieren minimaal één week op DM-II gehuisvest voordat de imaging buiten een veiligheidskabinet van klasse 2 kan plaatsvinden.

#### *Doden van de ratten aan het einde van het experiment*

Aan het einde van het experiment worden de ratten gedood. Dit vindt plaats middels cardiale perfusie van de rat met een 4% formaldehyde oplossing. Tijdens deze werkzaamheden zijn de gg-AAV deeltjes gefixeerd, er is echter wel  $\alpha$ -synucleïne in de rat aanwezig.

De COGEM adviseert deze handeling uit te voeren op DM-II inperkingsniveau en daarbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Open handelingen dienen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet klasse 2;
- Tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
- Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt, en is alleen toegestaan onder condities waarbij prik/snij-accidenten worden voorkomen (bv kevlar handschoenen);
- Het vaste afval en kleine volumina vloeibaar afval dient in breukvaste en lekdichte containers verzameld en als ziekenhuisafval door verbranding vernietigd te worden;
- De werkplekken dienen voorzien te worden van absorberend materiaal dat als ziekenhuisafval verbrand wordt;
- Vloeibaar afval dient gedurende een uur te worden geïncubeerd in een 8M ureum oplossing (eindconcentratie), gevolgd door minimale verhitting bij 121°C gedurende 30 minuten.

#### *Werkzaamheden met weefsels en cellen van de ratten uit dit experiment*

Na cardiale perfusie met 4% formaldehyde oplossing en vervolgens fixatie in 4% formaldehyde oplossing gedurende 24 uur zijn in de hersenen zullen alle gg-AAV deeltjes gefixeerd zijn. Het is volgens de COGEM waarschijnlijk dat  $\alpha$ -synucleïne niet gefixeerd zal zijn. Gezien het risico voor medewerkers<sup>19</sup>, die met het materiaal in aanraking komen, adviseert de COGEM om de werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau uit te voeren en daarbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Open handelingen dienen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet klasse 2;
- Tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
- Het gebruik van ‘sharps’ moet tot een minimum worden beperkt, en is alleen toegestaan onder condities waarbij prik/snij-accidenten worden voorkomen (bv kevlar handschoenen);
- Het vaste afval en kleine volumina vloeibaar afval dient in breukvaste en lekdichte containers verzameld en als ziekenhuisafval door verbranding vernietigd te worden;
- De werkplekken dienen voorzien te worden van absorberend materiaal dat als ziekenhuisafval verbrand wordt;
- Vloeibaar afval dient gedurende een uur te worden geïncubeerd in een 8M ureum oplossing (eindconcentratie), gevolgd door minimale verhitting bij 121°C gedurende 30 minuten.

#### *Aanvullende vragen van Bureau ggo*

##### *Werkzaamheden met gg-AAV deeltjes met andere promotoren*

Dit deel van het advies betreft werkzaamheden met gg-AAV waarbij de humane synapsin-1 promotor is vervangen door een andere promotor. Tijdens deze werkzaamheden worden dezelfde werkzaamheden uitgevoerd. De aanwezigheid van een andere promotor is niet van invloed op de uitkomst van de risicoanalyse. Zodoende gelden dezelfde voorwaarden als die hierboven beschreven zijn.

##### *Invasieve handelingen van transgene muizen, en handelingen met cellen en weefsels van deze muizen*

De COGEM adviseert het toedienen van ‘seeds’ aan de gg-muizen uit te voeren op DM-II inperkingsniveau en hierbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- Tijdens de werkzaamheden dienen handschoenen te worden gedragen;
- De ratten moeten vrij zijn van wildtype AAV, wildtype adenovirus en andere virussen die in een helperfunctie van AAV kunnen voorzien;
- Het gebruik van ‘sharps’ moet tot een minimum worden beperkt, en is alleen toegestaan onder condities waarbij prik/snij-accidenten worden voorkomen (bv kevlar handschoenen);
- Open handelingen, waaronder alle handelingen waarbij een ‘besmette’ filtertopkooi geopend wordt, worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd.

De COGEM adviseert de werkzaamheden met de weefsels en cellen van de gg-muizen onder dezelfde condities uit te voeren als die met de weefsels en cellen van de ratten.

## Referenties

1. 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 Inc., San Diego
2. Berns KI & Parrish CR (2013). *Parvoviridae*: The viruses and their replication. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
3. Smith-Arica JR en Bartlett JS (2001). Gene therapy: recombinant adeno-associated virus vectors. *Current cardiology reports* 3: 43-49
4. 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
5. Gonçalves MA (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology J.* doi:10.1186/1743-422X-2-43
6. Lashuel HA *et al.* (2013). The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat Rev Neurosci* 14: 38-48
7. Morales R *et al.* (2015). Prion-like features of misfolded A $\beta$  and tau aggregates. *Virus Res* 207: 106-112
8. Spillantini MG *et al.* (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839-840
9. Roberts HL & Brown DR (2015). Seeking a Mechanism for the Toxicity of Oligomeric alpha-Synuclein. *Biomolecules* 5: 282-305
10. Fonseca TL *et al.* (2015). The Interplay between Alpha-Synuclein Clearance and Spreading. *Biomolecules* 5: 435-471
11. Rey NL *et al.* (2013). Transfer of human alpha-synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice. *Acta Neuropathol* 126: 555-573
12. Li JY *et al.* (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 14: 501-503
13. Donello JE *et al.* (1998). Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* 72: 5085-5092
14. COGEM (2015). Een fase I/II klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met ernstige tot matig ernstige hemofilie B. COGEM advies CGM/150617-01
15. COGEM (2013). Een fase 2b klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met hartfalen. COGEM advies CGM/130603-03
16. COGEM (2006). Fase III klinische studie met genetisch gemodificeerde tumorcellijnen in patiënten met prostaatkanker. COGEM advies CGM/060829-01
17. COGEM (2002). Manipulatie van signaaltransductie in de hersenen. Advies CGM/020319-01
18. COGEM (2012). Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd AAV in muizen. Advies CGM/121122-02
19. COGEM (2015). Inschaling van werkzaamheden met het aggregerende eiwit  $\alpha$ -synucleïne. COGEM advies CGM/150501-05

20. Luk KC *et al.* (2012). Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338: 949-953
21. Recasens A *et al.* (2014). Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann Neurol* 75: 351-362
22. Lu X *et al.* (2014). Recombinant adenovirus-mediated overexpression of 3 $\beta$ -hydroxysteroid- $\Delta$ 24 reductase. *Neural Regen Res* 9: 504-12
23. Schweighauser M *et al.* (2015). Formaldehyde-fixed brain tissue from spontaneously ill  $\alpha$ -synuclein transgenic mice induces fatal  $\alpha$ -synucleinopathy in transgenic hosts. *Acta Neuropathol* 129: 157-159