

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 30 november 2009
KENMERK CGM/091130-05
ONDERWERP Advies: niet-replicerend adeno-associated virus in ratten en muizen

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een aanvraag tot wijziging van vergunning IG 00-114 met de titel 'Manipulatie van signaaltransductie in de hersenen' van het Universitair Medisch Centrum Utrecht, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting

De COGEM is verzocht te adviseren over terugplaatsing naar een lager inperkingsniveau van ratten en muizen geïnjecteerd met niet-replicerende gg-virusdeeltjes, gebaseerd op 'adeno-associated virus' serotype 1 (AAV1). De recombinante AAV1 viruspartikels worden in de hersenen van ratten of muizen geïnjecteerd, waarop de dieren na zeven dagen aan gedragsstudies worden onderworpen.

AAV is een virus dat mensen kan infecteren, maar geen symptomen veroorzaakt. Het virus kan alleen repliceren als er co-infectie plaatsvindt van de geïnfecteerde cel met een helpervirus, dat een herpes- of adenovirus kan zijn.

De aanvrager heeft voor de injectie van de virusdeeltjes in muizen en ratten en daaropvolgende huisvesting een vergunning op DM-II inperkingsniveau. Onder de voorwaarde dat er met behulp van een PCR gecontroleerd wordt dat er geen virusdeeltjes in het bloed van de ratten of muizen zitten, mogen de dieren zeven dagen na injectie op D-I niveau gehuisvest worden. De aanvrager wil de PCR test achterwege laten met het oog op het ongerief voor de proefdieren.

Om zijn aanvraag te onderbouwen heeft de aanvrager experimenten en literatuurgegevens overlegd. AAV1 blijkt zeer snel, met een halfwaardetijd van ongeveer één uur, in de bloedbaan afgebroken te worden. In door de aanvrager geteste dieren kon zeven dagen na injectie van recombinant AAV in de hersenen geen viraal DNA worden gevonden. Gezien de overlegde gegevens is de COGEM van mening dat de PCR test geen toegevoegde waarde heeft voor de veiligheid van mens en milieu. Terugplaatsing van de geïnfecteerde muizen of ratten zeven dagen na injectie in de hersenen, zal volgens de COGEM, zonder de uitvoering van een PCR test, tot een verwaarloosbaar klein risico voor mens en milieu leiden.

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 large loop followed by a horizontal stroke and a small vertical tick.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

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

***In vivo* experimenten met een vector gebaseerd op adeno-associated virus**

COGEM advies CGM/091130-05

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een wijzigingsaanvraag van de vergunning IG 00-114 met de titel 'Manipulatie van signaaltransductie in de hersenen' van Universitair Medisch Centrum Utrecht. Binnen het project worden de effecten van neuropeptiden, transcriptiefactoren en eiwitten betrokken bij de signaaltransductie in de hersenen bestudeerd. Transgenen, coderend voor bovenstaande peptiden en eiwitten, worden met behulp van een viraal transductiesysteem in het DNA van de hersenen geïnserteerd. Het virale transductiesysteem is gebaseerd op 'adeno-associated virus' (AAV) en produceert replicatie-deficiënte virale partikels. De viruspartikels worden in de hersenen van ratten of muizen geïnjecteerd, waarop ze na zeven dagen aan gedragsstudies worden onderworpen.

Adeno-associated virus

AAV behoort tot de familie *Parvoviridae* en het genus *Dependovirus*. Het is een enkelstrengs DNA virus met een genoom van circa 4,7 kb. Het genoom codeert voor twee genen, *rep* en *cap*. *Rep* is belangrijk voor replicatie, en *cap* codeert voor de virusmantel. De *rep* en *cap* genen worden geflankeerd door twee 'inverted terminal repeats' (ITR's), die zijn betrokken bij DNA-replicatie en integratie van het DNA in een chromosoom van de gastheer. Voor succesvolle replicatie van AAV is co-infectie van een helpervirus nodig, zoals een adenovirus of een herpesvirus.^{1,2,3} 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.¹ Er zijn verschillende serotypen van AAV bekend welke onder andere verschil vertonen in gastheerspecificiteit en weefseltropisme.^{2,4} 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 een ziektebeeld.⁵ Overdracht van het virus vindt waarschijnlijk plaats via de respiratoire of gastro-intestinale route.¹

Productiesysteem van replicatie-deficiënte AAV-partikels

Het productiesysteem uit de wijzigingsaanvraag levert replicatie-deficiënte AAV serotype 1 virusdeeltjes. De viruspartikels worden gegenereerd door plasmide pAAV en packaging/helperplasmide pDP1 te co-transfecteren in HEK 293T cellen. Het plasmide pAAV bevat de ITR's, de te expresseren genen en een 'green fluorescent protein' (GFP) sequentie onder controle van een CMV promotor. Het helperplasmide pDP1 bevat de voor de productie benodigde *rep* en *cap* genen, alsmede adenovirus type 5 helper functies VA, E2A en E4.

Eerder advies

De COGEM heeft eerder geadviseerd over de onderhavige vergunning.⁶ Zij heeft hierbij de risico's van het productiesysteem en de injectie van de viruspartikels in ratten of muizen besproken.

Het productiesysteem resulteert in een niet-replicerende vector, doordat de *rep* en *cap* genen alsmede de overige functies benodigd voor het maken van een virus op het helperplasmide gecodeerd liggen. De genetische informatie van het virus bevat enkel de ITRs en transgenen. Recombinatie tussen de plasmiden zal daarom niet optreden. Aanvullende maatregelen zoals het testen van de productiecellen op aanwezigheid van helpervirussen en het dragen van een neus- en mondkapje door de werknemers verkleinen het risico dat tijdens de productie van de virussen contaminatie optreedt met wildtype adeno- of herpesvirus. De COGEM was in haar advies van mening dat het in de vergunning genoemde productiesysteem niet zal leiden tot de vorming van replicatiecompetent AAV. Zij achtte de risico's van uitscheiding van het niet-replicerende virus verwaarloosbaar klein.

De COGEM adviseerde de injectie van het virus bij muizen en ratten plaats te laten vinden op DM-II inperkingsniveau, met aanvullende maatregelen ter voorkoming van infectie met wildtype adenovirussen. De dieren verblijven daarna één week op DM-II niveau. De aanvrager test de dieren met een PCR op de aanwezigheid van AAV deeltjes in het bloed van de dieren. De COGEM was van mening dat onder deze twee voorwaarden terugplaatsing van de dieren naar D-I inperkingsniveau plaats kan vinden, omdat gewaarborgd wordt dat er een minimale hoeveelheid virus in de proefdieren circuleert.

Adviesvraag

De aanvrager verzoekt om de eerder gestelde voorwaarde voor terugplaatsing van geïnjecteerde muizen of ratten naar D-I niveau, namelijk een PCR test op het bloed van deze dieren, te laten vallen. Dit vanwege het ongerief voor de dieren en het feit dat de aanvragers nog nooit virus hebben gevonden in het bloed, na toediening van de viruspartikels in de hersenen.

In vitro handelingen, zoals analyse van weefsels van met AAV-geïnjecteerde muizen of ratten, worden in dit advies niet door de COGEM in haar overweging meegenomen.

Overweging en advies

Ter onderbouwing van zijn verzoek voor het achterwege laten van de PCR test overlegt de aanvrager gegevens en literatuur.

De aanvrager geeft aan dat de te gebruiken ratten en muizen vrij zijn van wildtype AAV en helpervirussen. Hierdoor kan complementatie of recombinitie met recombinant AAV in de proefdieren worden uitgesloten.

In een studie door Zincarelli *et al.* (2008) is de afname van AAV serotype 1 na injectie in het bloed van muizen bepaald.⁴ Hierbij bleef van AAV1 na 1 uur minder dan 1% van het startmateriaal (1×10^{11} virale genomen) over in het bloed.

Ter verifiëring van de literatuur heeft de aanvrager een kwantitatieve PCR (qPCR) uitgevoerd op serum van ratten na injectie van 1×10^9 AAV1 genomische kopieën direct in de bloedbaan. Hierbij nam de hoeveelheid AAV1 kopieën die gemeten werd in het bloed snel af. De halfwaardetijd van AAV1 lag rond het uur. Bij deze halfwaardetijd zullen na 24 uur slechts enkele virusdeeltjes in het bloed voorkomen. Na zeven dagen zal van de oorspronkelijke 1×10^9 virusdeeltjes geen enkele meer over zijn.

De aanvrager geeft daarbij aan dat zij nog nooit viruspartikels in serum van de dieren hebben gevonden op zeven dagen na toediening in de hersenen. De aanvrager heeft dit op het serum van 66 ratten getest door middel van qPCR.

Uit de gegevens van de aanvrager en de literatuur blijkt dat AAV1 snel in het bloed van ratten en muizen afgebroken wordt, met een halfwaardetijd van ongeveer één uur. De snelle afname van AAV1 in het bloed onderschrijft de verwachting dat er zeven dagen na injectie in de bloedbaan geen vrije virusdeeltjes meer aanwezig zullen zijn in een muis of rat. De aanvragers injecteren AAV1 echter in de hersenen van de dieren. De halfwaardetijd van AAV1 in de hersenen zou kunnen verschillen van de halfwaardetijd in het bloed van muizen en ratten. Echter, de aanvragers hebben dit getest door injectie van 2×10^9 AAV1 virale genomen in de hersenen van ratten. Hierbij konden zij één uur na deze injectie geen virus detecteren in de bloedbaan.

Advies

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van mening dat de PCR test op AAV1 op dag 7 na injectie bij ratten en muizen geen toegevoegde waarde heeft voor de veiligheid van mens en milieu. Terugplaatsing van de ratten of muizen zeven dagen na injectie met AAV1 naar D-I inperkingsniveau, zonder uitvoering van een PCR test, zal naar de mening van de COGEM leiden tot een verwaarloosbaar klein risico voor mens en milieu.

Voor andere AAV serotypes wordt een vergelijkbare overweging als voor AAV1 door de COGEM gemaakt. Als gegevens over de halfwaardetijd van de AAV serotypes in de gebruikte proefdieren een voldoende snelle afbraak laten zien, acht de COGEM een PCR test overbodig.

Referenties

1. Knipe DM en Howley PM (2001). Fields virology, volume two, fourth edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
2. Van Regenmortel MHV (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego
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. Therapy 16:1073-1080
5. Gonçalves MA (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. Virology journal 2: 43

6. COGEM (2002). Advies: 'Manipulatie van signaaltransductie in de hersenen'. CGM/020319-01