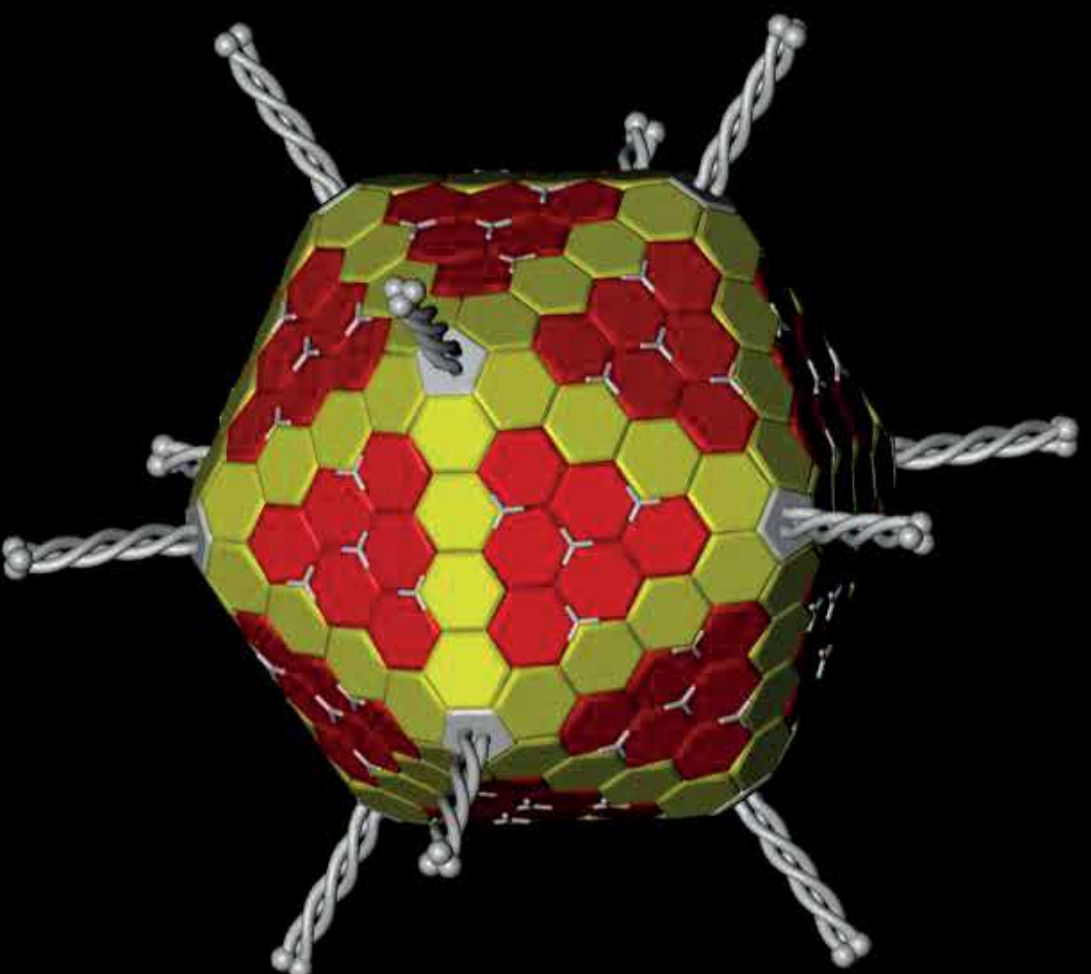
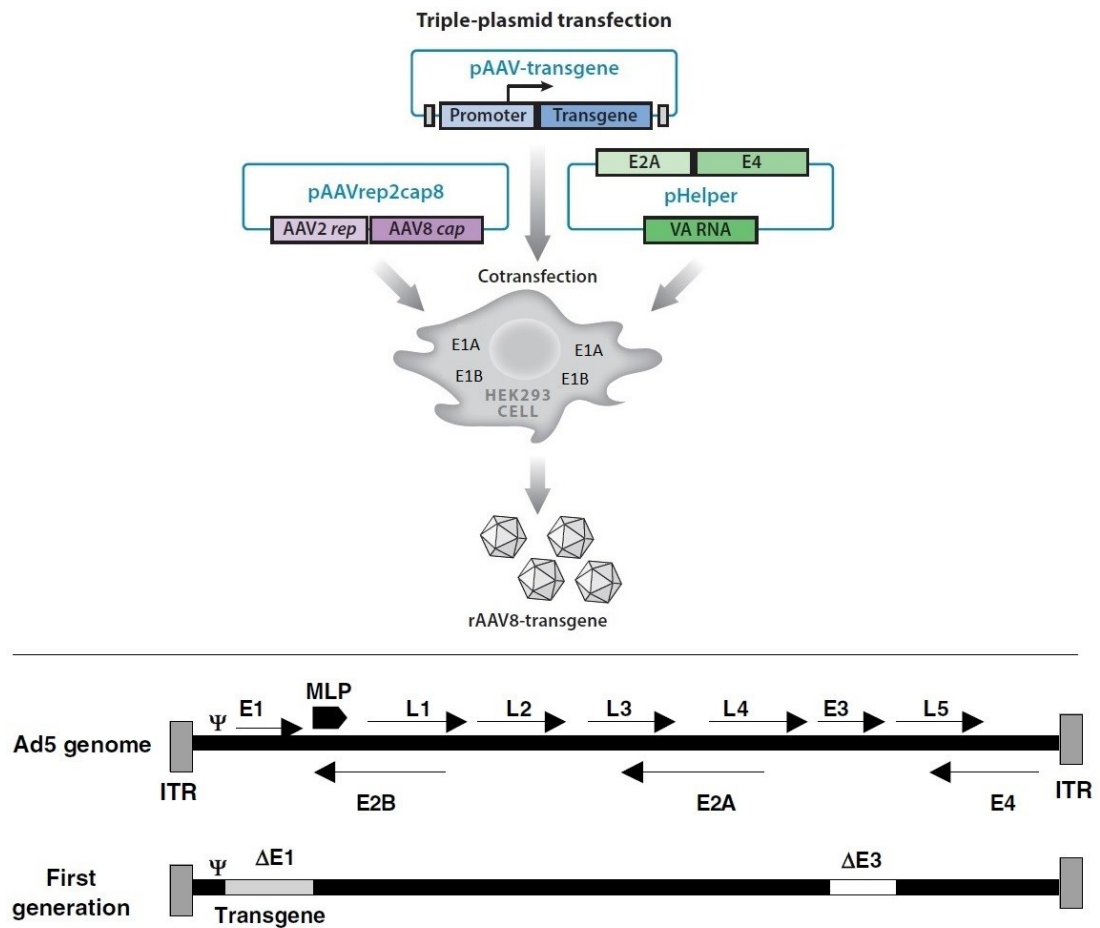
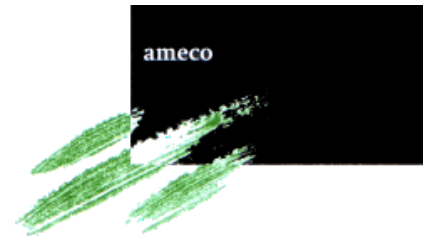


Omlaagschaling van werkzaamheden met replicatie-defectieve AAV- en adenovirale vectoren



CGM 2017-04

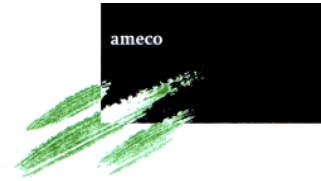
ONDERZOEKSRAAPPORT



**Omlaagschaling van werkzaamheden
met replicatie-defectieve AAV-
en adenovirale vectoren**

Kerngegevens

Titel, nummer:	Omlaagschaling van werkzaamheden met replicatie-defectieve AAV- en adenovirale vectoren CGM 2017-04
Opdrachtgever:	Commissie Genetische Modificatie (COGEM) Postbus 578 3720 AN Bilthoven Tel. 030-2742835 Contactpersoon: Mevr. Adrienne Box COGEM secretariaat adrienne.box@rivm.nl
Uitvoerder:	Ameco Adviesgroep Milieubeleid (Ameco) Koningslaan 60 3583 GN Utrecht Tel. 030-2545840 Contactpersoon: Dhr. Rik Kleinjans r.kleinjans@ameco-ut.nl in samenwerking met: Nederlands Herseninstituut Meibergdreef 47 1105 BA Amsterdam Tel. 020 566 5500 Contactpersoon: Prof. dr. J. Verhaagen j.verhaagen@nin.knaw.nl En: Erasmus Medisch Centrum Afdeling Neurochirurgie, Hersentumorcentrum Wytemaweg 80 3015 CN Rotterdam Tel. 010-7043825 Contactpersoon: Dr. J. de Vrij j.devrij@erasmusmc.nl
Auteurs:	Dr. J.E.N. Bergmans, Hans (Ameco) Prof. dr. J. Verhaagen, Joost (NIN) Dr. M. Lamfers, Martine (EMC) Dr. J. de Vrij, Jeroen (EMC) Drs. H.A.W. Kleinjans, Rik (Ameco)
Begeleidingscommissie:	Prof. dr. R.C. Hoeven, Rob (voorzitter; lid COGEM subcie MV, LUMC) dr. B.P.H. Peeters, Ben (lid COGEM subcie MV, WUR) prof. dr. V.W. van Beusechem, Victor (VUMC) prof. dr. F.A.J. van de Loo, Fons (Radboud UMC) drs. D. Louz, Derrick (Bureau GGO) ing. A.T.A. Box, Adrienne (COGEM-secretariaat)
Datum rapport:	Vergadering van de COGEM Subcommissie Medisch Veterinair d.d. 27 september 2017
Disclaimer:	<i>This report was commissioned by COGEM. The content of this publication is the sole responsibility of the author(s) and does not necessarily reflect the views of COGEM.</i> <i>Dit rapport is in opdracht van de Commissie Genetische Modificatie (COGEM) samengesteld. De mening die in het rapport wordt weergegeven is die van de auteur(s) en weerspiegelt niet noodzakelijkerwijs de mening van de COGEM.</i>



Voorwoord

Wetenschappelijk onderzoek naar het gebruik van virussen als vectoren voor genoverdracht heeft de afgelopen decennia een grote vlucht genomen. Met name in het biomedisch-onderzoek is het gebruik hiervan gemeengoed geworden. Vooral genoverdrachtvectoren afgeleid van adenovirussen (Ad) en van adeno-associated virussen (AAV) mogen zich in een grote populariteit verheugen. De Commissie Genetische Modificatie (COGEM) heeft de afgelopen jaren vele malen geadviseerd over deze vectorsystemen en met name over verzoeken tot omlaagschaling van de inperkingseisen die worden gesteld voor bepaalde handelingen met Ad en AAV vectoren.

Deze adviezen gaven de COGEM de indruk dat voor bepaalde werkzaamheden minder strenge veiligheidseisen noodzakelijk zijn en dat generieke omlaagschaling binnen de huidige regelgeving mogelijk zou kunnen zijn. Om dit te staven, heeft zij hierover een onderzoeksproject laten uitvoeren. Het project is uitgevoerd door Ameco Adviesgroep Milieubeleid (Ameco) in samenwerking met onderzoekers van het Nederlands Herseninstituut en het Erasmus Medisch Centrum (EMC).

De onderzoekers hebben een inventarisatie gemaakt van de gebruikte vectorsystemen en de productiemethoden voor Ad en AAV vectoren. Daarnaast is gekeken naar de eigenschappen van deze systemen die bepalend zijn voor hun veiligheid en inperking. Het rapport laat zien dat zowel Ad als AAV vectoren een lange historie van veilig gebruik hebben bij 'ingeperkt-gebruik' toepassingen. Ook bij 'introductie in het milieu' studies hebben deze vectoren een goed veiligheidsprofiel. Er zijn een aantal gekende aandachtsgebieden zoals de vorming van replicatie-competente virusdeeltjes als gevolg van recombinatie en de mobilisatie van vectoren door helpervirussen. Hiervoor zijn adequate tests en procedures waarmee deze factoren te beheersen zijn.

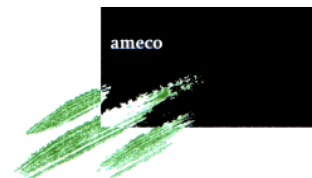
De onderzoekers concluderen op basis van hun bevindingen dat bepaalde handelingen met Ad en AAV vectoren op een lager inperkingsniveau uitgevoerd zouden kunnen worden dan op basis van de huidige regelgeving noodzakelijk is. In het rapport worden suggesties gedaan welke specifieke werkzaamheden met deze vectoren voor standaard omlaagschaling in aanmerking kunnen komen.

Deze opdracht van de COGEM lijkt een eerste stap te bieden naar een voorstel over welke vectorsystemen en werkzaamheden met Ad en AAV vectoren omlaag geschaald kunnen worden. Waarom is dit belangrijk? Het biomedisch onderzoek is de afgelopen decennia veranderd. Biomedisch onderzoek is erg multidisciplinair geworden en vaak worden geavanceerde technieken en apparatuur gebruikt om biologische processen in cellen en dieren te monitoren. Wanneer we beschikken over methoden om hierin efficiënt genen te brengen, kunnen we de expressie van bepaalde genen beïnvloeden en de effecten daarvan bestuderen. Bijvoorbeeld in onderzoek dat moet nagaan of gentherapie bij een bepaalde aandoening haalbaar is. AAV en Ad vectoren zijn hiervoor bij uitstek geschikt.

Vaak wordt bij dit onderzoek analyseapparatuur gebruikt die niet in de vereiste inperking te plaatsen is. Denk hiervoor bijvoorbeeld aan zeer gevoelige CCD camera's, MRI scanners, flow-cytometers, of confocale microscopen. Door na te gaan welke inperkingseisen voor Ad en AAV vectoren noodzakelijk zijn en waar de eisen wellicht kunnen worden verlicht, kan dit geavanceerde onderzoek worden gefaciliteerd. Dit kan het onderzoek, maar ook het draagvlak van de onderzoekers voor de vereiste inperkingsmaatregelen, positief beïnvloeden.

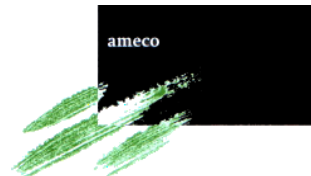
Het rapport is zeer uitvoerig en goed leesbaar. Zowel voor de COGEM als voor stakeholders biedt het handvatten voor het inschatten van de risico's die met het werk met Ad en AAV vectoren geassocieerd kunnen zijn. De uitvoerders van Ameco, EMC en Herseninstituut verdienen dan ook lof voor de uitvoering van dit project en het gedegen rapport dat hiervan het resultaat is. De begeleidingscommissie heeft met veel plezier bijgedragen aan dit project.

Rob Hoeben
Voorzitter begeleidingscommissie

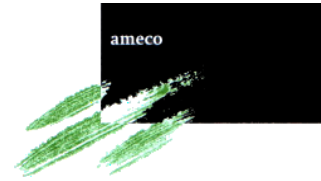


Inhoud

Voorwoord	3
Inhoud	4
Gebruikte afkortingen	6
Samenvatting	7
Summary	9
1 Inleiding	12
1.1 Aanleiding en doel van het project	12
1.2 Definities	13
1.3 Milieurisicoanalyse van ingeperkt gebruik van genetisch gemodificeerde virale vectoren ..	14
1.4 COGEM adviezen over ingeperkt gebruik van replicatie-defectieve AAV- en Ad-vectoren..	16
1.4.1. Overzicht COGEM adviezen betreffende AAV-vectoren	16
1.4.2. Overzicht COGEM adviezen betreffende Ad-vectoren.....	18
2 AAV-vectoren	20
2.1 Overzicht adeno-associated virus (AAV).....	20
2.1.1. Taxonomie, serotypen	20
2.1.2 Pathogeniteitsklasse van AAV	21
2.1.3 Moleculaire beschrijving van AAV	22
2.2 AAV-vectoren	24
2.2.1 AAV-vector productiesystemen	24
2.2.2 Modificaties van capsid-eiwitten	25
2.3 Elementen voor de milieurisicoanalyse van AAV-vectoren.....	26
2.3.1 Pathogeniteit van AAV; biologische inperking van AAV-vectoren	27
2.3.2 Complementatie en recombinatie	28
2.3.3 Persistentie van AAV-vectoren na toediening aan een proefdier	28
2.3.4 Veiligheid van AAV-vectoren.....	30
3 Replicatie-defectieve Ad-vectoren	32
3.1 Overzicht Adenovirus.....	32
3.1.1 Taxonomie, serotypen	32
3.1.2 Pathogeniteitsklasse van adenovirus	33
3.1.3 Moleculaire beschrijving van adenovirus	33
3.2 Replicatie-defectieve Ad-vectoren	35
3.2.1 'Eerste generatie' replicatie-defectieve Ad-vectoren	35
3.2.2 'Tweede generatie' replicatie-defectieve Ad-vectoren.....	38
3.2.3 Helper afhankelijk (HD) Ad-vectoren.....	39
3.2.4 Modificaties van capsid eiwitten; hybride vectoren	40
3.2.4.1 Genetische en niet-genetische aanpassingen van het capsid van de vector.....	40
3.2.4.2 Vectoren afgeleid van verschillende typen adenovirussen	41
3.2.4.3 Versnelde evolutie van adenovirale vectoren.....	42
3.3 Elementen voor de risicoanalyse van replicatie-defectieve Ad-vectoren	42
3.3.1 Pathogeniteit van adenovirus en Ad-vectoren; biologische inperking van Ad-vectoren.....	42
3.3.2 Vorming van RCA en replicatie-competente vectoren.....	43
3.3.3 Persistentie van Ad-vectoren na toediening aan een proefdier	44



3.3.4 Veiligheid van Ad-vectoren	45
4 Discussie.....	46
4.1 Overwegingen voor de inschaling van replicatie-defectieve AAV- en Ad-vectoren	46
4.2 Elementen voor de risicoanalyse van het ingeperkt gebruik van AAV-vectoren	46
4.2.1 Pathogeniteit en biologische inperking van AAV en AAV-vectoren	46
4.2.2 De mogelijkheid van recombinatie en complementatie tussen de vector en wt AAV	47
4.2.3 Persistentie en shedding van een AAV-vector na toediening aan een proefdier	48
4.2.4 Gebleken veiligheid van AAV-vectoren	49
4.3 Elementen voor de risicoanalyse van het ingeperkt gebruik van Ad-vectoren	49
4.3.1 Pathogeniteit en biologische inperking van adenovirus en Ad-vectoren	49
4.3.2 De mogelijkheid van recombinatie en complementatie tussen de vector en wt adenovirus	50
4.3.3 Persistentie en shedding van een Ad-vector na toediening aan een proefdier	52
4.3.4 Gebleken veiligheid van Ad-vectoren	52
4.4 Overwegingen over de benodigde fysische inperking	53
4.5 Conclusies ten aanzien van de inschaling	54
4.5.1 Conclusies ten aanzien van de inschaling van AAV-vectoren	54
4.5.2 Conclusie ten aanzien van de inschaling van Ad-vectoren	56
4.5.3 Opmerkingen bij de resultaten van de survey (bijlage 4)	57
Referenties	58
Bijlagen	65
Bijlage 1 - Inschalingsregels voor genetisch gemodificeerde virussen en virale vectoren	65
Bijlage 2 - (Pathogeniteits)klassen van micro-organismen	69
Bijlage 3 - Inrichtings- en werkvoorschriften ML-I, ML-II, DM-I en DM-II ruimten	70
Bijlage 4 / Appendix 4 - Survey of applicable Biosafety measures for Contained use of AAV and adenovirus vectors	73



Gebruikte afkortingen

AAV	adeno-associated virus
Ad-	adenovirus-
ARBO	arbeidsomstandigheden
BSL	biosafety level (bioveiligheidsniveau, vergelijkbaar met de 'ML' en 'DM' niveaus)
CAR	Coxsackievirus en adenovirus receptor
COGEM	Commissie Genetische Modificatie
Δ	deletie
D-I	fysische inperking voor genetisch gemodificeerde dieren
DM	niveaus van fysische inperking (DM-I t/m DM-IV) voor werkzaamheden in dierver- blijven met dieren in associatie met genetisch gemodificeerde micro-organismen
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorter
ggo	genetisch gemodificeerd organisme
GMP	Good Manufacturing Practice
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IG	(wettelijke regels voor het) ingeperkt gebruik;
ITR	Inverted terminal repeat
orf	open reading frame
ML	niveaus van fysische inperking (ML-I-ML-IV) voor laboratoriumwerkzaamheden met genetisch gemodificeerde micro-organismen
moi	multipliciteit van infectieuze deeltjes; ook: aantal virale vectoren toegevoegd per cel
PCR	polymerase kettingreactie (polymerase chain reaction)
RCA	replicatie competent adenovirus
SDS	natrium dodecylsulfaat
vg	vectorgenomen
VK	veiligheidskabinet; bedoeld wordt steeds een veiligheidskabinet van klasse II
wt	wild type

Samenvatting

Dit rapport is opgesteld in opdracht van de COGEM en dient ter voorbereiding van een mogelijk door de COGEM op te stellen generiek advies over de voorwaarden waaronder omlaagschaling van werkzaamheden met replicatie-defectieve AAV- en adenovirus (Ad-)vectoren mogelijk is.

In het rapport worden de volgende conclusies getrokken over de risico's die verbonden zijn aan het ingeperkt gebruik (IG) van zowel AAV-vectoren als replicatie defectieve Ad-vectoren, die geen inserties dragen welke coderen voor schadelijke genproducten:

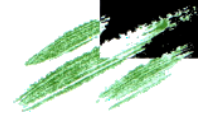
- AAV, van AAV-afgeleide vectoren alsook replicatie-defectieve Ad-vectoren behoren tot de micro-organismen van klasse 1.
- AAV-vectoren zijn replicatie defectief; bij de productie van AAV-vectoren wordt bij de nu in gebruik zijnde systemen geen replicatie-competent AAV gevormd.
- Bij de productie van replicatie-defectieve Ad-vectoren kunnen bij het ontwerpen van productiesystemen voorzorgen worden genomen zodat hierbij geen RCA wordt gevormd; deze voorzorgen kunnen worden gegarandeerd door een goede karakterisering van de productiecellijn en de gebruikte vector.
- De risico's verbonden aan experimenten onder IG met batches van deze vectoren zijn verwaarloosbaar klein als het insert niet codeert voor een schadelijk genproduct. Deze experimenten kunnen zonder bezwaar worden uitgevoerd onder de omstandigheden en met de werkvoorschriften beschreven voor ML-I en DM-I omstandigheden, zonder dat daarbij aanvullende voorschriften noodzakelijk zijn.
- Proefdieren die met deze vectoren zijn geïnjecteerd kunnen na enkele dagen, wanneer kan worden verwacht dat geen infectieuze vectordeeltjes meer worden uitgescheiden, worden geplaatst in een D-I ruimte.
- Handelingen met deze vectoren, waarbij de gebruikte cellen en vectoren niet worden vermenigvuldigd, kunnen, als dat om praktische redenen gewenst is, ook worden uitgevoerd buiten de fysieke inperking van een ML-I laboratorium, waarbij de werkvoorschriften van ML-I in acht moeten worden genomen.

Hoofdstuk 1 omvat een aantal achtergrondgegevens: de omschrijving van het doel van het project, een kort overzicht van de manier waarop de risicoanalyse van ggo's voor handelingen onder IG wordt uitgevoerd, en een overzicht van eerder uitgebrachte COGEM adviezen.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de eigenschappen en de genetische opbouw van AAV, en behandelt de nu in gebruik zijnde productiesystemen voor batches van deze vectoren.

Vervolgens worden de elementen behandeld voor de risicoanalyse van het ingeperkt gebruik van deze vectoren: het gebrek aan pathogeniteit, overwegingen over recombinatie en complementatie waardoor de vectoren (al dan niet) zouden kunnen repliceren, de persistentie van de vectoren na toediening aan een proefdier en gegevens over de veiligheid van de toepassing van AAV-vectoren.

Hoofdstuk 3 geeft een zelfde overzicht voor Ad-vectoren. Hierbij wordt aandacht besteed aan de verschillende generaties van vectoren, en de voorzorgen die moeten worden genomen zodat er bij de

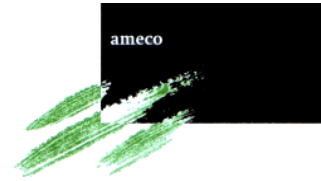


productie van batches van de vector geen replicatie competente virussen of vectoren worden gevormd. Ook hier wordt een overzicht gegeven van de elementen voor de risicoanalyse van het ingeperkt gebruik van de vectoren.

Hoofdstuk 4 geeft een overzicht van de resultaten die gepresenteerd zijn in de hoofdstukken 2 en 3, en een discussie over de betekenis van deze resultaten voor de risicoanalyse. Het hoofdstuk eindigt met een uitgebreidere formulering van de conclusie die hierboven kort is samengevat.

Om een beeld te krijgen van de omstandigheden waaronder in het buitenland wordt gewerkt met AAV- en Ad-vectoren is een rondvraag (survey) gehouden onder een aantal instituten. In bijlage 4 wordt het resultaat van deze survey besproken. De resultaten van de survey laten in grote lijnen zien dat de conclusie dat AAV-vectoren kunnen worden gehanteerd op BSL¹, ook elders wordt gedeeld. Ad-vectoren worden in principe gehanteerd op BSL2, maar in het Verenigd Koninkrijk wordt een meer gedifferentieerde aanpak gevolgd, die leidt tot vergelijkbare conclusies als die in dit rapport.

¹ BSL: biosafety level; de termen BSL1 en BSL2, zoals ze worden gebruikt in verschillende regelgevingssystemen, verschillen enigszins in detail, maar zijn vergelijkbaar.



Summary

This report, commissioned by the Netherlands Commission on Genetic Modification COGEM, aims to present a scientific underpinning of a general advice that is considered by the Commission on the adequate biosafety level for experiments under contained use with replication defective AAV and adenovirus vectors that do not contain an insert that encodes a hazardous gene product. Until now, such experiments in laboratories and animal facilities have been performed, in principle, at biosafety level 2 (i.e., the levels ML-II and DM-II; in the Netherlands legislation ML and DM levels are biosafety levels for microbiological laboratories and facilities where animals are kept that have been infected with genetically modified micro-organisms, respectively. Safety precautions taken at ML laboratories and DM animal facilities aim to protect human health as well as the environment). Advices to reduce the biosafety level to ML-I and DM-I have until now been given only after case-by-case risk assessment. The general advice would provide guidance on the conditions and criteria that should be met for performing experiments with AAV and adenovirus vectors under ML-I and DM-I containment.

In summary, the following conclusions are drawn in this report:

- AAV, vectors derived from AAV as well as replication defective adenovirus vectors meet the criteria for micro-organisms of pathogenicity class 1.
- AAV vectors are replication defective by nature. In current production systems for AAV vectors no replication-competent AAV is formed.
- In production systems for adenovirus vectors precautions can be taken to prevent the formation of RCA. A thorough characterisation of the adenovirus sequences in the production cell line and the deleted sequences in the vector provides a guarantee that no RCA will be formed.
- The risks inherent to experiments under contained use with these vectors are negligible if they do not carry an insert coding for a harmful gene product. Experiments can be performed in laboratories and animal facilities at ML-I and DM-I, without a need for additional safety measures.
- Laboratory animals injected with these vectors can be placed after some days, when no more shedding of infective vector particles is expected, in an animal facility without specific containment for micro-organisms.
- If the practical necessity exists, activities with these vectors in cell lines, where the cells and vectors are not propagated, can be performed in laboratories that do not have a specific biosafety qualification, provided that the ML-I working instructions apply.

Chapter 1 of the report summarises the risk assessment methodology for activities with micro-organisms under contained use in the Netherlands. Activities with viral vectors have to be performed, in principle, at ML-II (or higher), dependent on the pathogenicity class: class 2 or higher. On previous occasions COGEM has advised accordingly, but has also advised that the biosafety level can be reduced on basis of a case-by-case risk assessment.

Chapter 2 of the report provides scientific background for the risk assessment of AAV vectors. Wt AAV is a naturally 'crippled' virus that requires for its propagation co-infection by a helper virus, such as an adenovirus or a herpesvirus. Contrary to current practice, AAV (and consequently AAV vectors) should belong to pathogenicity class 1.

In current production systems for AAV vectors, the genetic information needed for replication and packaging of the vector (the *rep* and *cap* genes) and the required genes of the helper virus are provided on separate plasmids. Such production systems will deliver only infectious particles of the AAV vector, no helper virus or wt AAV.

Complementation leading to replication of an AAV vector can occur, but requires the presence of wt AAV as well as a helper virus in the same cell. Recombination of an AAV vector with other AAV sequence present in a cell cannot lead to the formation of replication competent AAV that also carries a transgene.

AAV vectors are known to persist in transduced cells *in vivo* for long periods up to several years.

After administration, an AAV vector may spread to various organs, depending on the way of delivery of the vector. This will lead to some degree of shedding. Shedding is routinely measured as the presence of vector genomes in the excreta. Experiments that measure the infectivity of shedded vectors show that infective vectors are only shed for a short period, in the order of several days.

AAV vectors have been proved to be safe in many clinical trials. One AAV product, Glybera, has been registered in the EU for medical use.

Chapter 3 of the report provides scientific background for the risk assessment of adenovirus vectors. All adenovirus genera, isolated from a large array of animals, and all serotypes are classified as class 2, regardless the provenance (human or animal).

In first and second generation replication defective adenovirus vectors one or several regions of the adenovirus genome involved in replication are deleted.

In helper Dependent (HD) adenovirus vectors only the ITRs, necessary for adenovirus replication, and the packaging signal (ψ) are retained.

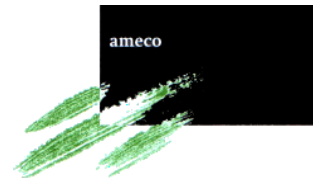
The production of replication defective adenovirus vectors requires the complementation of the various regions that have been deleted, but that are required for replication of the vector.

Replication defective adenovirus vectors lack the (expression of) functions that cause the pathogenicity of wt adenovirus. The vectors are attenuated, and meet the criteria for a class 1 micro-organism. Replication defective adenovirus can be mobilised by replication competent adenovirus (RCA) present in the same cell. RCA may be formed in production systems by recombination, if there is overlap between the flanking regions of the deletions in the vector and the adenovirus sequences in the genome of the production cell line. If such overlap does not exist, no RCA will be formed.

Recombination between an adenovirus vector and a wt adenovirus, which could in principle occur if the vector 'encounters' an adenovirus during its use, could result in the formation of an RCA, that could potentially carry a transgene. The chance of producing such a recombinant RCA can be minimised by introducing the transgene into (one of) the deletions causing the replication defect.

After administration, adenovirus vectors may spread to various organs, depending on the way of delivery, predominantly the liver and spleen. Adenovirus will also be present in the blood circulation. Shedding of adenovirus particles will occur, but shedding of infectious particle only occurs during the first week after administration.

Replication-defective adenovirus vectors have been shown to be safe and well tolerated in numerous clinical trials. The demise of the patient in one clinical trial is probably due to insufficient consideration of the conditions of the patient.



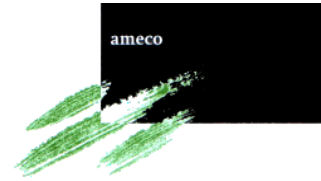
Chapter 4 presents an overview of the consideration for risk assessment presented in chapters 2 and 3. A decision tree is presented for the conditions that should be met in production systems for replication-defective adenovirus vectors without the chance of occurrence of RCA.

The risk involved in handling AAV vectors and replication defective adenovirus vectors, not carrying an insert that codes for a harmful gene product, can be considered apathogenic. When these vectors are handled in accordance with the working instructions required at the lowest biosafety level (avoidance of direct contact with the vector, avoidance of aerosol formation), the risk involved is negligible.

Shedding of infectious vector particles is likely to occur only for a few days after administration and is unlikely to lead to cross contamination. A waiting period of a few days at DM-I containment after administration of the vector will be sufficient, after which the animals in D-I can be kept under D-I conditions, without precautions for containing micro-organisms.

Both for AAV vectors and for adenovirus vectors there are occasional situations where, for practical reasons, they have to be handled in laboratories without a qualified level of physical containment. This can be allowed if safety precautions are taken comparable to ML-I: formation of aerosols should be avoided, and the workplace and equipment used is decontaminated after use. Presence of free vector particles in samples used can be limited by washing before the samples are transported to the room outside qualified physical containment.

A survey among institutes in Europe and in the U.S. (see appendix 4) yielded 2 responses about AAV vectors and 5 about adenovirus vectors. The conclusions about AAV vectors are largely shared by both respondents. Activities with adenovirus vectors are by and large uniformly performed at BSL2, but in the U.K. a more differentiated approach is chosen, compatible with the conclusions in this report.



1 Inleiding

Dit hoofdstuk presenteert algemene achtergronden bij deze studie. Eerst wordt ingegaan op de overwegingen van de COGEM voor dit rapport. In een aantal gevallen heeft de COGEM geadviseerd om werkzaamheden met AAV- en adenovirale (Ad-)vectoren onder IG uit te voeren onder lagere dan de standaard fysieke inperking. Voor een algemeen advies hieromtrent is er behoefte aan een beschouwing over de risico's die verbonden zijn aan werkzaamheden met deze vectoren. Verder geeft dit hoofdstuk een aantal gebruikte definities, een overzicht van de standaard milieurisicoanalyse zoals die wordt uitgevoerd voor virale vectoren, en een overzicht van eerdere adviezen van de COGEM over IG van AAV- en Ad-vectoren.

1.1 Aanleiding en doel van het project

De aanleiding voor het onderzoek is in de offertevraag van de COGEM als volgt geformuleerd:

'Bij de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) in laboratoria e.d. is de pathogeniteitsklasse van het uitgangsgenoom leidend. Dit betekent dat werkzaamheden met een klasse 2 virus op ML-II moeten plaatsvinden en werkzaamheden met een klasse 3 virus op ML-III. Omlaagschaling van de werkzaamheden kan onder meer als het ggo biologisch ingeperkt of verminderd pathogeen is.

De COGEM heeft in de afgelopen jaren verscheidene malen geadviseerd om werkzaamheden met biologisch ingeperkte (replicatie-defectieve²) virussystemen lager in te schalen dan werkzaamheden met de (replicatie-competente of volvirulente) uitgangsvirussen. Mede gezien het toenemend aantal werkzaamheden met replicatie-defectieve virussen streeft de COGEM ernaar om na te gaan waar mogelijk de werkzaamheden met bepaalde virussystemen standaard omlaag kunnen worden geschaald. Zo heeft de COGEM in 2009 een generiek advies uitgebracht ([CGM/090331-03](#)) over de omlaagschaling van bepaalde lentivirale vectoren. Hierdoor worden werkzaamheden met zogenaamde 2^e en 3^e generatie lentivirale vectoren in veel gevallen ingeschaald op ML-II of ML-I in plaats van ML-III. Gezien het grote aantal zeer uiteenlopende virussystemen waarmee gewerkt wordt, is het echter niet mogelijk om alle replicatie-defectieve virale vectoren bij voorbaat lager in te schalen.

Virussen die veelvuldig toegepast worden als replicatie-defectieve virale vector zijn onder meer adenovirussen en adeno-associated virussen (AAV). De COGEM overweegt daarom om voor deze twee virussen een generiek advies opstellen met daarin de voorwaarden waaronder omlaagschaling van

² Virale vectoren die niet kunnen repliceren onder omstandigheden waaronder het wt virus dat wel kan worden ook aangeduid als 'replicatie-deficiënt' of 'replicatie-incompetent'. Replicatie-incompetent wordt dan gebruikt voor vectoren die een functie missen die direct betrokken is bij de replicatie, terwijl 'replicatie-deficiënt' wordt gebruikt voor vectoren die om een andere reden niet kunnen repliceren, zoals E1 gedeleteerde ($\Delta E1$) Ad-vectoren, waar de *expressie* is verstoord van de genen coderend voor de direct bij de replicatie betrokken functies. De termen worden echter niet steeds consequent in deze betekenissen gebruikt. Daarom wordt in dit rapport de term 'replicatie-defectief' gebruikt voor alle typen vectoren waarvan de replicatie is verstoord, zie de definities in paragraaf 1.2.

werkzaamheden met replicatie-defectieve virussystemen mogelijk is. Hiervoor is het noodzakelijk dat de verschillende virale vectorsystemen gebaseerd op adenovirus of AAV in kaart gebracht worden en een indeling gemaakt wordt op eigenschappen. Aan de hand van deze inventarisatie kan een voorstel opgesteld worden over welke virussystemen en werkzaamheden - mogelijk onder voorwaarden- om-laaggeschaald kunnen worden.'

In de offertevraag is de doelstelling als volgt geformuleerd:

'Ter stroomlijning van de vergunningverlening wil de COGEM voor replicatie-defectieve adenovirale vectoren en voor replicatie-defectieve AAV-vectoren laten inventariseren: 1) welke vectoren en bijbehorende productiecellijnen/systemen er zijn, en wat bekend is over deze systemen, zoals de mogelijkheden tot reversie tot replicatie-competent virus, complementatie, integratie, stabiliteit, shedding, en 2) welke werkzaamheden met deze vectoren in aanmerking komen voor een standaard omlaagschaling.'

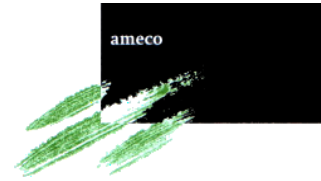
In dit rapport worden eerst de wetenschappelijke gegevens besproken over AAV- en Ad-vectoren die van belang zijn voor de risicoanalyse. De gegevens worden gepresenteerd voor AAV-vectoren in hoofdstuk 2 en voor Ad-vectoren in hoofdstuk 3. Hoofdstuk 4 geeft een discussie van de betekenis van deze gegevens voor de risicoanalyse van het ingeperkt gebruik van deze vectoren. De conclusie waartoe deze overwegingen leiden zijn hierboven samengevat in de sectie Conclusies.

Naast de desk research voor dit onderzoek is er ook een rondvraag gedaan naar de ervaringen die zijn opgedaan in een aantal instituten in het buitenland. De resultaten van deze rondvraag worden gepresenteerd in bijlage 4.

1.2 Definities

In dit rapport worden de volgende definities gehanteerd:

- AAV- en Ad-vector: een viruspartikel dat een DNA sequentie bevat, afgeleid van een wt (wild type) AAV of adenovirus, waarbij een deel van het virale genoom is gedeleteerd en vervangen door een gewenst transgen.
De tekst van het rapport volgt het spraakgebruik waarbij de term ook wordt gebruikt voor het genoom van het vectorpartikel.
- Replicatie-competent virus:
een virus dat autonoom kan repliceren onder de omstandigheden waaronder het wt virus van nature voorkomt. Volgens deze definitie is ook wt AAV een replicatie-competent virus, ook al is voor de replicatie van AAV de aanwezigheid van een helpervirus nodig.
- Replicatie-competente virale vector:
een virale vector die autonoom kan repliceren, onder dezelfde omstandigheden waaronder het wt virus kan repliceren.
- Replicatie-defectieve virale vector:
een virale vector die niet autonoom kan repliceren onder de omstandigheden waaronder het wt virus wel kan repliceren. Replicatie-defectieve virale vectoren kunnen wel worden gebracht onder omstandigheden waaronder zij kunnen repliceren, bijvoorbeeld in een daarvoor ontworpen cellijn zoals in een vector productiesysteem.



- Schadelijk genproduct:

Artikel 2.1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (verder: de Regeling³) geeft als definitie van een *schadelijk genproduct*: 'genproduct dat een mogelijk toxische, carcinogene, allergene, pathogene of immuun-modulerende eigenschap heeft, dan wel een genproduct dat kan bijdragen aan de verspreiding van ingebracht genetisch materiaal, dan wel tot een antibioticumresistentie kan leiden waardoor de toepassing van medicijnen ter bestrijding van ziekteverwekkers in gevaar wordt gebracht'.

1.3 Milieurisicoanalyse van ingeperkt gebruik van genetisch gemodificeerde virale vectoren

In dit rapport wordt, in overeenstemming met de doelstelling in paragraaf 1.1, gekeken naar de eigenschappen van vectorsystemen die zijn afgeleid van AAV en van adenovirussen, die verband houden met de inschaling van deze vectorsystemen onder IG. Die inschaling gebeurt op basis van een milieurisicoanalyse, conform de regels van Bijlage 5 van de Regeling (zie bijlage 1).

De milieurisicoanalyse van ggo's volgt een vast stramien, dat bijvoorbeeld is vastgelegd in de Europese ggo regelgeving (zie hierover het COGEM rapport [CGM 2016-05](#)). Het milieurisico bevat twee componenten: de veiligheid van de menselijke gezondheid en de veiligheid van het milieu. Met 'menselijke gezondheid' wordt hier bedoeld: de gezondheid van de mens in het algemeen, maar niet de gezondheid van een patiënt die wordt blootgesteld aan een genetisch gemodificeerd organisme, of de gezondheid van een medewerker voor zover die onder de ARBO-regelgeving valt. De kans op besmetting van een medewerker met het ggo wordt wel in de risicoanalyse in beschouwing genomen, in die zin dat de besmetting kan leiden tot versleping van het ggo uit de ingeperkte ruimte.

Voor de bepaling van het milieurisico wordt de formule gebruikt: risico = (schadelijkheid van een) effect x kans. Voor de schadelijkheid van een effect wordt vaak de term 'hazard' gebruikt.

De milieurisicoanalyse neemt achtereenvolgens de volgende overwegingen in beschouwing:

1. De karakterisering van het ggo: eigenschappen van het uitgangsgenorganisme, van het genetisch materiaal dat daarin is gebracht, de veranderde eigenschappen van het ggo die het gevolg zijn van de modificatie, en de schadelijke effecten die het ggo daardoor zou kunnen hebben;
2. Een beschouwing over de mogelijke consequenties van de schadelijke effecten van het ggo en de kans dat een schadelijk effect ook daadwerkelijk optreedt onder de omstandigheden waaronder het ggo wordt toegepast;
3. Op basis van (1) en (2), een inschatting van het risico van de toepassing van het ggo;
4. Als uit de conclusie onder (3) blijkt dat het risico niet verwaarloosbaar is: mogelijkheden voor het toepassen van risicobeheersingsmaatregelen;

³ De Nederlandse regelgeving voor activiteiten met genetisch gemodificeerde organismen ligt vast in het Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer (2013), dat algemene regels geeft. Voor de gedetailleerde uitwerking van de regels verwijst het Besluit naar de Regeling genetisch gemodificeerde organismen. De reden voor deze opbouw is dat de gedetailleerde regels in een Regeling vaker aanpassing behoeven dan de algemene regels in het Besluit. Aanpassing van een regeling vereist minder administratieve handelingen dan die van een besluit en kan daardoor eenvoudiger en sneller worden doorgevoerd.

5. Een inschatting van het risico, dit alles in beschouwing nemende.

Bij de risicoanalyse van het ingeperkt gebruik van ggo's wordt een methodologie gevolgd die is geënt op de bovenstaande beschouwingen. De conclusie van deze risicoanalyse (stappen 4 en 5) wordt in Bijlage 5 van de Regeling samengevat in een 'inschaling': het niveau van fysische inperking dat nodig is om de risico's van de handelingen verwaarloosbaar klein te maken. De inschalingsregels voor activiteiten met genetisch gemodificeerde virussen en virale vectoren worden gegeven in de paragrafen 5.4.2 en 5.4.3 van bijlage 5 van de Regeling.

In deze inschalingsregels zien we de overwegingen van de punten 1 en 2 van de milieurisicoanalyse (karakterisering van het ggo en de potentieel schadelijke effecten; en de kans dat de schadelijke effecten worden gerealiseerd) terug.

De potentieel schadelijke eigenschappen van het ggo worden onder meer bepaald aan de hand van

- De pathogeniteitsklasse van het uitgangsvirus⁴
- Bij inserts die afkomstig zijn van een ander virus: de klasse van het betreffende virus (er wordt dan overwogen of het insert daadwerkelijk aanleiding kan zijn tot pathogene of schadelijke effecten), en de kans dat het insert leidt tot de productie van autonoom replicerend virus;
- De vraag of het insert codeert voor een schadelijk genproduct.

De kans dat er schadelijke effecten optreden wordt onder meer bepaald aan de hand van

- De biologische inperking van de combinatie van de gastheercel, de virale vector en de donorsequentie;
de virale vectoren waarvoor biologische inperking is vastgesteld worden expliciet vermeld in paragraaf 5.4.2 van de Regeling;
- Bij biologisch niet-ingeperkte virussen wordt in paragraaf 5.4.3 van de Regeling een aantal virussen/virusstammen gespecificeerd waarvoor een lagere inschaling is vastgesteld; deze lagere inschaling is bepaald op basis van het feit dat er bij hun toepassing een lagere kans is op optreden van schadelijke effecten.

Om te komen tot de juiste inschaling van handelingen met AAV- en Ad-vectorsystemen zullen de eigenschappen van deze systemen moeten worden geïnterpreteerd tegen de achtergrond van de hierboven beschreven milieurisicoanalyse.

De beschouwingen in dit rapport beperken zich tot replicatie-defectieve AAV- en Ad-vectoren, en die op die basis kunnen worden beschouwd als geattenuëerd; verder beperkt het rapport zich tot vectoren die een insert dragen dat niet codeert voor een schadelijk genproduct.

Bij de factor 'kans' moet worden meegewogen dat de blootstelling van een medewerker laag zal zijn. Het zal voornamelijk gaan om blootstelling via aërosolen. Hiermee moet rekening worden gehouden bij de interpretatie van gegevens over mogelijke schadelijke effecten van AAV- en Ad-vectoren afkomstig uit studies waarin een patiënt wordt blootgesteld aan een dosis die vele orden van grootte hoger is. De blootstelling van een medewerker onder IG zal vele orden van grootte lager zijn dan bij toepassingen van de vector voor gentherapie, waar met grotere doses wordt gewerkt dan doorgaans in het in het laboratorium het geval is. De blootstelling zal aërogeen zijn, terwijl dat bij klinische studies veelal via injectie is.

⁴ De (pathogeniteits)klasse van micro-organismen wordt bepaald aan de hand van een aantal criteria, die zijn opgesomd in bijlage 2.

1.4 COGEM adviezen over ingeperkt gebruik van replicatie-defectieve AAV- en Ad-vectoren

De COGEM heeft in de voorafgaande jaren een aantal adviezen afgegeven omtrent het ingeperkt gebruik van AAV- en Ad-vectoren. In de volgende paragrafen wordt een overzicht gegeven van de voor dit rapport relevante adviezen.

1.4.1. Overzicht COGEM adviezen betreffende AAV-vectoren

De COGEM beschouwt AAV als een klasse 2 pathogeen ([CGM/141218-02](#), zie ook paragraaf 2.1.2). Bij gebruik van een donorsequentie die niet codeert voor een schadelijk genproduct komt de inschaling van het ingeperkt gebruik van AAV-vectoren dan in principe uit op ML-II en DM-II paragraaf (5.4.3 van de Regeling).

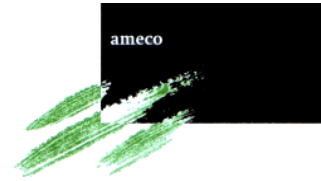
Bij adviezen over werkzaamheden met AAV-vectoren gaat het over vectorbatches die zijn geproduceerd met behulp van een productieceldlijn die vrij is van wt AAV en helpervirussen (adenovirus), waarbij afdoende voorzorgen zijn genomen tegen het optreden van recombinatie. De vorming van auto-noom replicerend recombinant AAV is daarbij uitgesloten. Wanneer proefdieren worden gebruikt zijn ook deze vrij van AAV en helpervirus (adenovirus).

Geadviseerde inperkingsniveaus en voorschriften bij de toediening van AAV-vectoren aan proefdieren.
Over de risico's van het ontstaan van aërosolen zegt advies [CGM/020319-01](#) het volgende. Het gaat in dat geval om injectie van AAV deeltjes in de hersenen van ratten, onder een microscoop. Deze handeling zal plaatsvinden buiten een veiligheidskabinet, in een DM-II ruimte die tijdens de werkzaamheden afgesloten zal zijn. De injectiespuit zal gevuld worden onder ML-II, en worden vervoerd naar het DM-II verblijf. De plaats van injectie zal worden afgenomen met 70% alcohol en vervolgens worden gesloten. Aërosolvorming moet zoveel mogelijk worden beperkt. Gedurende de werkzaamheden dienen de medewerkers een neus- en mondkapje te dragen. De ratten moeten direct na toediening in een filtertopkooi worden geplaatst. De DM-II ruimte zal tijdens de handelingen gesloten blijven. De COGEM gaat ervan uit dat aërosolvorming en verspreiding daarbij niet geheel voorkomen kunnen worden. Maar, gezien de aard van de te gebruiken vectoren, is het onwaarschijnlijk dat er sprake is van een aanzienlijk risico voor mens en milieu. Het advies [CGM/121122-02](#) komt tot vergelijkbare conclusies voor het toedienen van AAV5- en AAV6-vectoren in het netvlies van muizen.

In advies [CGM/160831-01](#) worden resusapen in de hersenen geïnjecteerd met AAV1-, -2-, -5- en -6-vectoren. Het voorstel van de aanvrager om deze handeling op DM-III uit te voeren is conform de Regeling en de COGEM stemt hiermee in.

Invasieve handelingen bij dieren die met AAV-vectoren zijn geïnjecteerd.

Advies [CGM/161108-01](#) stelt dat door invasieve handelingen de natuurlijk inperking binnen het dier wordt doorbroken. In het geïnjecteerde weefsel kunnen nog AAV-vectordeeltjes aanwezig zijn die



daarbij vrij kunnen komen. Invasieve handelingen met geïnjecteerde dieren en handelingen met weefsels van deze dieren kunnen op D-I en ML-I worden ingeschaald, met als aanvullende voorschriften dat in het laboratorium waarin betreffende werkzaamheden worden uitgevoerd het dragen van een bril en een mond- en neuskapje verplicht is, en dat tijdens de werkzaamheden handschoenen worden gedragen.

Plaatsing van met AAV-vectoren geïnjecteerde proefdieren in D-I.

In advies [CGM/020319-01](#) vinden de aanvragers bij een PCR bepaling 3 dagen na intracerebrale toediening aan ratten van $2 \cdot 10^8$ AAV2-vectordeeltjes, geen vectordeeltjes in het serum. De toegepaste PCR maakt voldoende aannemelijk dat de hoeveelheid vector die een week na injectie nog in de ratten circuleert minimaal zal zijn. De vector is niet replicatiecompetent zodat er geen kans bestaat voor de productie van een replicatiecompetent virus. Zelfs al zou de vector worden uitgescheiden dan kan het risico als verwaarloosbaar klein worden beschouwd. De dieren kunnen daarom na een week worden geplaatst in een D-I verblijf. In [CGM/091130-05](#) wordt een AAV1-vector intracerebraal geïnjecteerd in muizen. Er zijn gegevens overgelegd dat de vector zeer snel (halfwaardetijd 1 uur) in de bloedbaan wordt geïnactiveerd. In dergelijke gevallen heeft een PCR bepaling geen toegevoegde waarde, en kunnen de proefdieren (muizen) 7 dagen na toediening worden geplaatst in D-I.

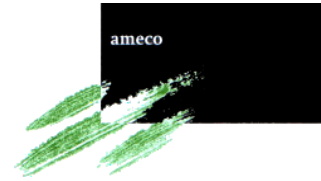
In [CGM/121122-02](#) wordt op vergelijkbare gronden geconcludeerd dat er geen bezwaar is tegen het plaatsen van muizen in D-I, zeven dagen na injectie van AAV5- en AAV6-vectoren in het netvlies.

Advies [CGM/161108-01](#) geeft een uitgebreide beschouwing over de plaatsing in D-I van muizen en ratten die zijn geïnjecteerd met verschillende serotypen AAV-vectoren. Dieren kunnen worden geplaatst in D-I als is aangetoond dat het bloed vrij is van AAV-vectordeeltjes. Op basis van deze bepaling kan een algemene regel worden geformuleerd voor het soort proefdier, de hoeveelheid van het geïnjecteerde vectortype, en de periode waarna tot plaatsing in D-I kan worden overgegaan. Op basis van haar eerdere gegevens kunnen bijvoorbeeld dieren die met maximaal 1×10^9 AAV1-, -2-, -5- en -6-vectordeeltjes zijn geïnjecteerd, na een week worden teruggeplaatst naar D-I.

In [CGM/160831-01](#) wil de aanvrager apen die in de hersenen zijn geïnjecteerd met AAV1-, -2-, -5- en -6-vectoren, na een week overbrengen naar D-I. Een probleem is in dit geval dat er niet gegarandeerd kan worden dat de apen vrij zijn van wt AAV en van helpervirus. Apen die verschijnselen vertonen die geassocieerd kunnen worden met een overte helpervirusinfectie moeten daarom van de studie worden uitgesloten. Voordat de dieren in D-I geplaatst worden moet de afwezigheid van AAV-vectordeeltjes in het bloed van de apen met een test worden bevestigd.

Werkzaamheden in ruimten zonder gekwalificeerd niveau van fysieke inperking.

In [CGM/070905-03](#) worden handelingen verricht met hybride vectoren waarin segmenten van adenovirus en AAV worden gecombineerd. De aanvrager wil handelingen met celcultures uitvoeren in een ruimte die geen gekwalificeerde fysieke inperking heeft. Daar is geen bezwaar tegen als de celcultures meerdere malen worden gewassen zodat de aanwezigheid van vectordeeltjes wordt geminimaliseerd. De uiteindelijke hoeveelheid infectieuze deeltjes die nog over kunnen zijn, is dermate gering dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn. Bij de werkzaamheden moeten ML-II werkvoorschriften in acht worden genomen, en aanvullende voorschriften: tijdens de FACS handelingen moeten de laboratoriummedewerkers een mond- en neuskapje dragen; personen die immuungecompromiteerd zijn of tijdens de experimenten een overte adenovirusinfectie doormaken mogen niet bij



de experimenten aanwezig zijn; na afloop van de FACS handelingen wordt het FACS apparaat doorgepoeld met een verse chlooroplossing en wordt het afval hiermee geïnactiveerd; na afloop van het experiment moeten de gebruikte materialen en werkoppervlakten ontsmet worden met 1% SDS gevolgd door 70% ethanol.

1.4.2. Overzicht COGEM adviezen betreffende Ad-vectoren

De inschaling van ingeperkt gebruik van Ad-vectoren gebeurt in principe volgens paragraaf 5.4.3 van de Regeling. Ad-vectoren zijn afgeleid van een klasse 2 pathogeen, en bij gebruik van een donorsequentie die niet codeert voor een schadelijk genproduct is de inschaling volgens de Regeling ML-II en DM-II (voor toepassingen in grote proefdieren geldt DM-III, vanwege de kans op aërogene overdracht).

Inschaling van werkzaamheden met Ad-vectoren.

In advies [CGM/121210-01](#) wordt de inschaling bediscussieerd van Ad-vectoren afgeleid van adenovirussen van chimpansees, bonobo's en gorilla's, die leven in gevangenschap. De dieren vertonen geen symptomen van ziekte. De virale vectoren worden replicatie-defectief gemaakt door deletie van het E1 gebied. Van de gebruikte adenovirussen wordt verondersteld dat ze niet meer pathogeen zijn voor de mens dan eerder beschreven primatenadenovirussen en ze kunnen daarom behandeld worden als klasse 2 pathogeen. Werkzaamheden met deze nieuwe adenovirussen uit apen kunnen plaatsvinden op ML-II inperkingsniveau, met aanvullende voorschriften, die standaard zijn voor werkzaamheden met adenovirussen: open handelingen dienen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet van klasse-II; het dragen van handschoenen is verplicht. Werkzaamheden met de replicatie-defectieve Ad-vectoren op basis van de nieuwe apenadenovirussen kunnen conform dit advies plaatsvinden op ML-I inperkingsniveau. In gevallen waarin gebruik wordt gemaakt van de PER.C6 cellijn en een vector waarbij er geen overlap is tussen de sequenties die de E1 deletie in de vector flankeren en de in de cellijn aanwezige E1 sequenties zal geen RCA ontstaan. Ook de cellijnen 911 en 293 kunnen worden gebruikt; in alle gevallen zal de afwezigheid van RCA periodiek worden gecontroleerd. (De gepubliceerde methode van Pietersen et al. (1999) is beoordeeld als voldoende gevoelig (<1 RCA per 5×10^7 vectordeeltjes) voor dit doel).

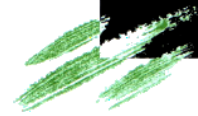
In volgende adviezen worden vergelijkbare werkzaamheden ingeschaald op ML-II met de beschreven aanvullende maatregelen ([CGM/130606-01](#), [CGM/160906-01](#), [CGM/161124-02](#), [CGM/170123-01](#)). Het gaat daar om humane adenovirussen, of om bovine, simian, murine, chimpansee of slangenadenovirussen en daarvan afgeleide vectoren, en om een breed scala aan op adenovirus gebaseerde transgene chimere genetisch gemodificeerde vectoren afkomstig van mens, apen en slangen.

De inschaling op ML-II is gebaseerd op het feit dat er geen insert wordt gebruikt dat genetische informatie bevat voor een schadelijk genproduct. Is dat wel het geval dan is de inschaling hoger, bijvoorbeeld in [CGM/140707-01](#), waar een genoom van *Hepatitis B virus* is ingebouwd in een Ad-vector. De inschaling is dan ML-III en DM-III.

Plaatsing van proefdieren in D-I.

Over het verplaatsen van een DM inperkingsniveau naar het D-I inperkingsniveau van proefdieren die zijn geïnfecteerd met een Ad-vector is door de COGEM een aantal malen geadviseerd.

In [CGM/021216-03](#) wordt gesteld dat apen die geen adenovirale infectie dragen, na injectie met een (replicatie-defectieve) Ad-vector kunnen worden geplaatst in een D-I verblijf (niet in een 'normaal'

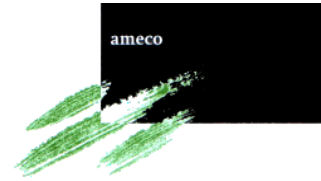


diervverblijf, zie [CGM/030918-01](#)) als met een gevalideerde PCR test is aangetoond dat de dieren geen shedding van de vector vertonen.

Ratten die zijn geïnjecteerd met een Ad-vector gebaseerd op canine adenovirus kunnen een week na toediening worden overgebracht naar een D-I verblijf ([CGM/130902-01](#)). Hiervoor zijn de volgende overwegingen in beschouwing genomen: canine adenovirus repliceert niet in ratten- en muizencellen, de vector wordt geproduceerd onder omstandigheden waarbij geen RCA kan worden gevormd, en reeds na één dag is de vector niet meer aantoonbaar in het bloed van ratten. Over verplaatsing van met canine Ad-vectoren geïnjecteerde muizen naar D-I kan geen beslissing worden genomen, omdat voor muizen geen vergelijkbare gegevens beschikbaar zijn.

Werkzaamheden in ruimten zonder gekwalificeerd niveau van fysieke inperking.

Over handelingen met animale cellen die zijn getransduceerd met replicatie-defectieve Ad-vectoren heeft de COGEM geadviseerd ([CGM/060313-06](#)) dat zij plaats kunnen vinden in een ruimte die geen gekwalificeerde fysieke inperking heeft, als is aangetoond dat de gebruikte cellen vrij zijn van adenovirus, en de gevolgde kweek- en wasprocedures voldoende garanties bieden dat er geen vrije vectordeeltjes aanwezig zijn in de celsuspensie (zie ook [CGM/060911-01](#), [CGM/070905-03](#)).



2 AAV-vectoren

Dit hoofdstuk begint met een overzicht van de relevante eigenschappen van AAV: de taxonomie en de voorkomende serotypen, het cel- en weefseltropisme van AAV, de pathogeniteitsklasse, en een moleculaire beschrijving van het virus en de courante AAV-vectorsystemen. Vervolgens worden de gegevens over AAV-vectoren besproken die van belang zijn voor de risicoanalyse.

2.1 Overzicht adeno-associated virus (AAV)

2.1.1. Taxonomie, serotypen

AAV (adeno-associated virus) hoort tot de familie *Parvoviridae*, geslacht *Dependoparvovirus*. De ICTV onderscheidt twee soorten *Dependoparvovirus*: *Adeno-associated Dependoparvovirus A* en *Adeno-associated Dependoparvovirus B*⁵.

Er worden in de literatuur 12 serotypen van AAV onderscheiden. De serotypen zijn afkomstig van de mens of van niet-humane primaten; de herkomst is niet steeds eenduidig. Gao et al. (2004) zeggen over het voorkomen van AAV in de natuur: 'Little is known about the biology of AAV infections, although a significant proportion of humans and nonhuman primates have antibodies in their blood that react to some of the ... existing serotypes of AAV. This suggests that primates are hosts for infection with AAV ...' Een aantal AAV serotypen is geïsoleerd uit adenovirus stocks van humane herkomst of uit niet-humane primaten of uit weefsels van de mens of van niet-humane primaten. AAV1 is geïsoleerd uit humaan weefsel, maar antilichamen zijn aangetoond in niet-humane primaten. AAV2, 3, 5 zijn van humane herkomst. AAV4 is afkomstig uit niet-humane primaten, waar ook antilichamen worden gevonden. AAV6 lijkt een recombinant tussen AAV1 en AAV2 te zijn. AAV7-12 zijn afkomstig uit niet-humane primaten. Daarnaast is een honderdtal capsid varianten bekend; de betreffende *cap* genen zijn met behulp van PCR geïsoleerd uit humaan weefsel of uit weefsel van niet-humane primaten. Deze varianten zijn niet serologisch getypeerd (Wu et al., 2006; zie ook Gao et al., 2002, Mori et al., 2004, Schmidt et al., 2008).

De serotypen vertonen een verschillend weefseltropisme. Een belangrijke stap in de ontwikkeling van een AAV-vector is daarom de keuze van het serotype. Grieger et al. (2006) zeggen hierover: 'Because different rAAV serotype vectors have different tissue tropisms, it is important to identify the best serotypes to be used in an experiment. It is important to note that the vectors could behave differently when used in vitro (cell culture) versus in vivo (animal) because the behavior of a cell line could be significantly different from the parental tissue cell type.' The table (zie Tabel 1) summarizes cell/tissue types, identified in animal models, that are transduced efficiently by various AAV serotypes.' (Voor referenties bij de tabel zie Grieger et al., 2006; gebruikte diermodellen zijn: muis, rat, primate, hamster.)

⁵ ICTV: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>; zie daar onder 'virus families not assigned to order', de familie *Parvoviridae*. ICTV proposal: <https://talk.ictvonline.org/ICTV/proposals/2013.001a-aaaV.A.v4.Parvoviridae.pdf>

Tabel 1 Voorbeelden van het *in vivo* weefsel tropisme van een aantal AAV serotypen
(Grieger et al., 2006)

AAV serotype	Tissue types, identified in animal models, that are transduced efficiently by various AAV serotypes
AAV1	Vascular endothelium Muscle
AAV2	Brain Liver Muscle
AAV3	Cochlear inner hair cells
AAV4	Ependyma and astrocytes
AAV5	Lung epithelial cells Retina Brain Arthritic joint tissue
AAV6	Muscle Lung
AAV7	Muscle
AAV8	Liver Heart Pancreas
AAV9	Heart

2.1.2 Pathogeniteitsklasse van AAV

De paragraaf 4.1.1 van de Regeling geeft, in lijn met adviezen van de COGEM ([CGM/141218-02](#)), aan dat de serotypen 1-9 worden gerekend tot pathogeniteitsklasse 2.

Door het Belgische Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid ([WIV-ISP](#)) wordt AAV gerekend tot pathogeniteitsklasse 2. Bij de Duitse Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin ([BAuA](#)) worden AAV1, -4 en -6 tot -11 ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. AAV2, -3 en -5 worden door de BAuA ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. De [Europese Richtlijn 2000/54/EC](#) vermeldt AAV niet. De NIH Guidelines (National Institutes of Health, 2016) rekenen AAV (alle serotypen) tot Risk Group 1: 'Agents that are not associated with disease in healthy adult humans'.

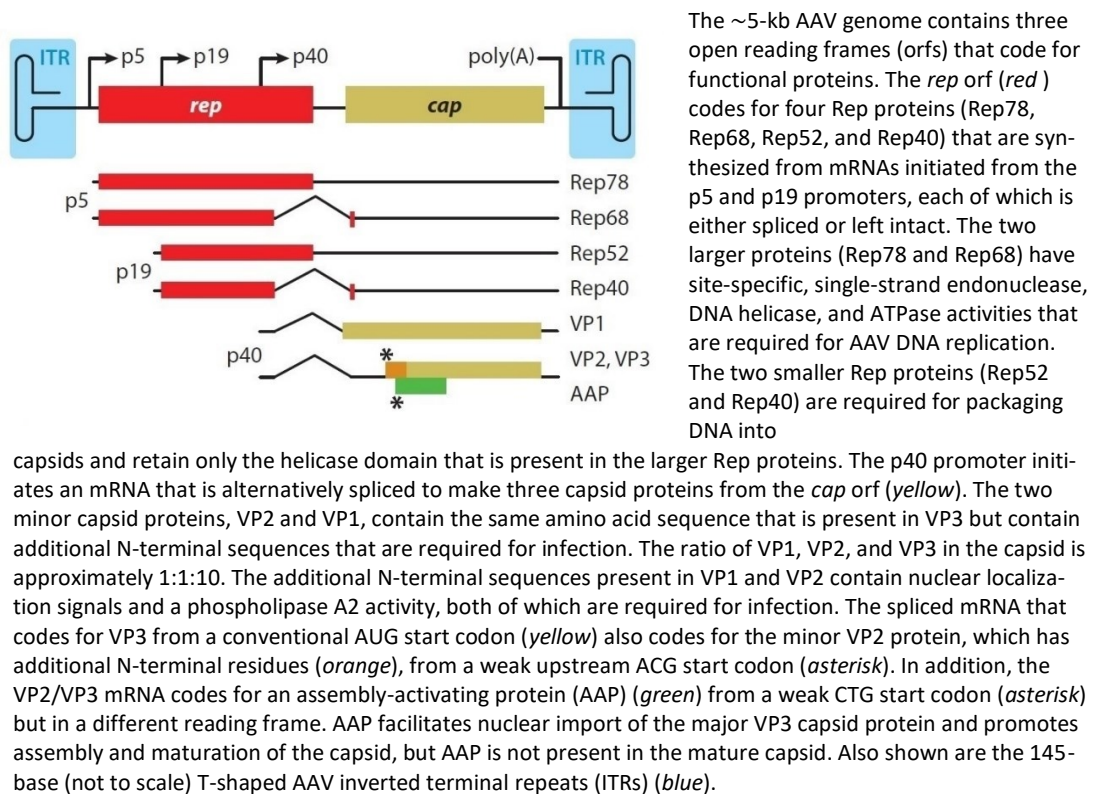
In de literatuur wordt algemeen gesteld dat AAV niet in verband wordt gebracht met een bekend ziektebeeld, en dus apathogeen is (zie bijv. Blacklow et al., 1971). In de literatuur (bijv. Grimm, 2015) wordt AAV genoemd als niet-pathogeen. Eigen literatuuronderzoek heeft geen steekhoudende rapportage van pathogene effecten van enig serotype of enige variant van AAV opgeleverd. Wel wordt er gediscussieerd over de vraag of AAV oncogeen is, omdat het wt virus kan integreren in het genoom. Die integratie verloopt alleen in aanwezigheid van *rep* genproducten. In een recent review geven Srivastava en Carter (2017) het oordeel dat er voor wt AAV2 een overweldigende hoeveelheid bewijs is ('overwhelming, albeit circumstantial, evidence') dat het virus niet geassocieerd is met oncogene effecten. Integendeel, er is evidentie dat het virus een beschermende werking heeft tegen tumorvorming. Eerdere claims (Tenenbaum et al., 2003) dat AAV een rol zou spelen bij abortus en mannelijke steriliteit zijn niet houdbaar gebleken (Garolla et al., 2013).

2.1.3 Moleculaire beschrijving van AAV

Het AAV viruspartikel bestaat uit 3 eiwitten, VP1, VP2 en VP3, die verschillende splicingsproducten zijn van het *cap* gen. In het capsid bevindt zich een ssDNA molecuul van 5,2 kb lengte. Dit is ook de maximale lengte van een AAV-vector (langere vectoren worden getrunkeerd aan het 5'eind tot maximaal 5,2 kb (Wu et al., 2010).

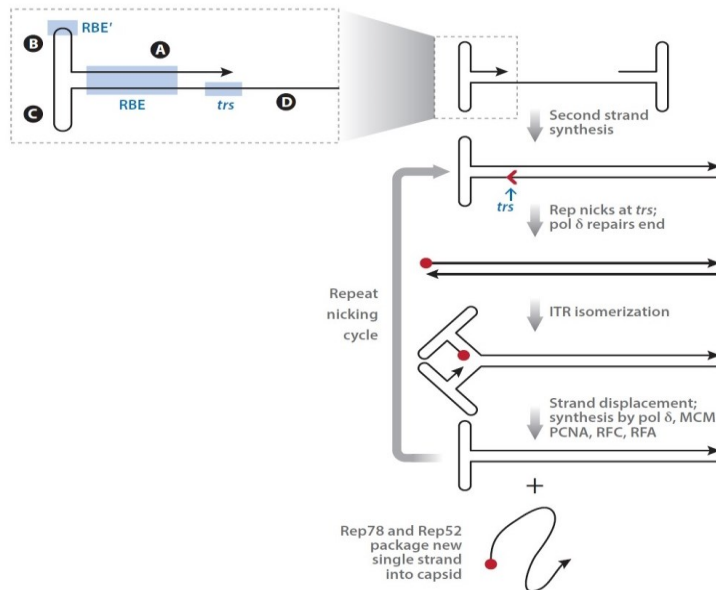
Het genoom van AAV bestaat uit twee coderende sequenties, de genen *rep* en *cap*, geflankeerd door de ITRs (inverted terminal repeats). Figuur 1 geeft een schematisch beeld van de genetische organisatie van AAV.

Figuur 1 AAV, genetische organisatie (overgenomen uit Samulski en Muzyczka, 2014)



De ITRs zijn noodzakelijk voor de replicatie van het ssDNA dat zich tussen de ITRs bevindt. Na opname van een ssDNA in de cel vormen de ITRs zich tot twee hairpins (figuur 2). Een van de twee hairpins levert een 3'-OH uiteinde waaraan de replicatie geïnitieerd kan worden. Deze replicatie wordt uitgevoerd door het DNA polymerase δ (een herstelpolymerase) van de gastheercel en een aantal hulp-eiwitten, en kan doorlopen tot het 5' uiteinde van het ssDNA. Het product van deze replicatie is een lange dsDNA hairpin waarbij de strengen aan één uiteinde worden verbonden door een ITR. Deze ITR moet nog gerepliceerd worden om een geheel dsDNA te krijgen. Hiertoe wordt een 3'OH primer ge

Figuur 2 AAV replicatie (overgenomen uit Samulski en Muzyczka, 2014)



The inverted terminal repeat (ITR) of AAV consists of two small palindromes (B and C) flanked by a larger palindrome (A) and an additional 20-base sequence (D) that is repeated at both ends. The ITR contains a 22-bp sequence (Rep-binding element RBE) that binds the AAV Rep78 and Rep68 proteins in a specific orientation. If the ITR is in the palindromic (hairpinned) configuration, the Rep protein also contacts a 5-base sequence at the tip of one of the short palindromes (RBE'), which activates the Rep DNA helicase and strand-specific endonuclease activities. When AAV DNA is uncoated in the nucleus, the ITR of the incoming single-stranded genome snaps into a hairpin that provides a natural 3'-OH primer (*small arrow*) for the synthesis of the second strand. This produces a duplex molecule that has a covalently closed (hairpinned) end.

The large Rep proteins then bind RBE and RBE' within the hairpin, and the activated endonuclease cleaves one strand at a specific site within a 7-base recognition sequence called the terminal resolution site (*trs*) (*blue arrow*). This creates a new 3'-OH primer (*red arrowhead*) that is used to repair the ITR to form a normal blunt-ended duplex molecule. During cleavage, a molecule of Rep78 or Rep68 (*red circle*) is covalently attached to the 5'-end phosphate via a tyrosine-phosphate linkage. The ITR is then reconfigured into a double hairpin to produce a 3'-OH primer (*red arrowhead*) that directs strand displacement synthesis down the length of the genome using the cellular complexes pol δ, MCM, and their accessory proteins. This displaces a single strand, which is packaged, and reforms a duplex molecule that is covalently closed at one end, beginning a new cycle of nicking, repair, and strand displacement synthesis. Each time this cycle is repeated, a new single strand is generated for packaging. Because the two ends are identical, the process occurs equally well from both ends, generating both positive and negative strands for packaging. Abbreviations: MCM, minichromosome maintenance complex; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; pol δ, polymerase δ; RFA, replication factor A; RFC, replication factor C.

creëerd door het Rep78 of Rep68 eiwit. Rep bindt aan de RBE (Rep binding element) sequenties en maakt een nick in het dsDNA bij *trs*, de terminal resolution site in de ITR. Rep heeft een helicase functie die nodig is voor zijn rol in de replicatie. Verder verzorgt Rep de opname van het ssDNA in een AAV capsid, door te binden aan het 5' uiteinde van het ssDNA en het DNA naar de porie in het capsid te leiden. Figuur 2 geeft een schematisch beeld en een gedetailleerde beschrijving van het replicatieproces van AAV.

De replicatie van AAV, en van een AAV-vector, kan alleen verlopen in aanwezigheid van twee ITRs en de Rep eiwitten. In afwezigheid van de Rep eiwitten vindt alleen de eerste omzetting plaats van een ssDNA naar een dsDNA structuur. dsDNAs wordt omgezet in lineaire of circulaire 'head-to-head' concatameren, door replicatie en ook door recombinatie tussen de monomeren (Berns, 1990; Gonçalves, 2005; Yang et al., 1999). Concatameren van AAV-vectoren, die immers geen *rep* dragen, blijven episomaal in de cel aanwezig zonder te repliceren. Wanneer Rep beschikbaar komt, door een wt AAV infectie, kunnen ook de AAV-vectoren worden gerepliceerd.

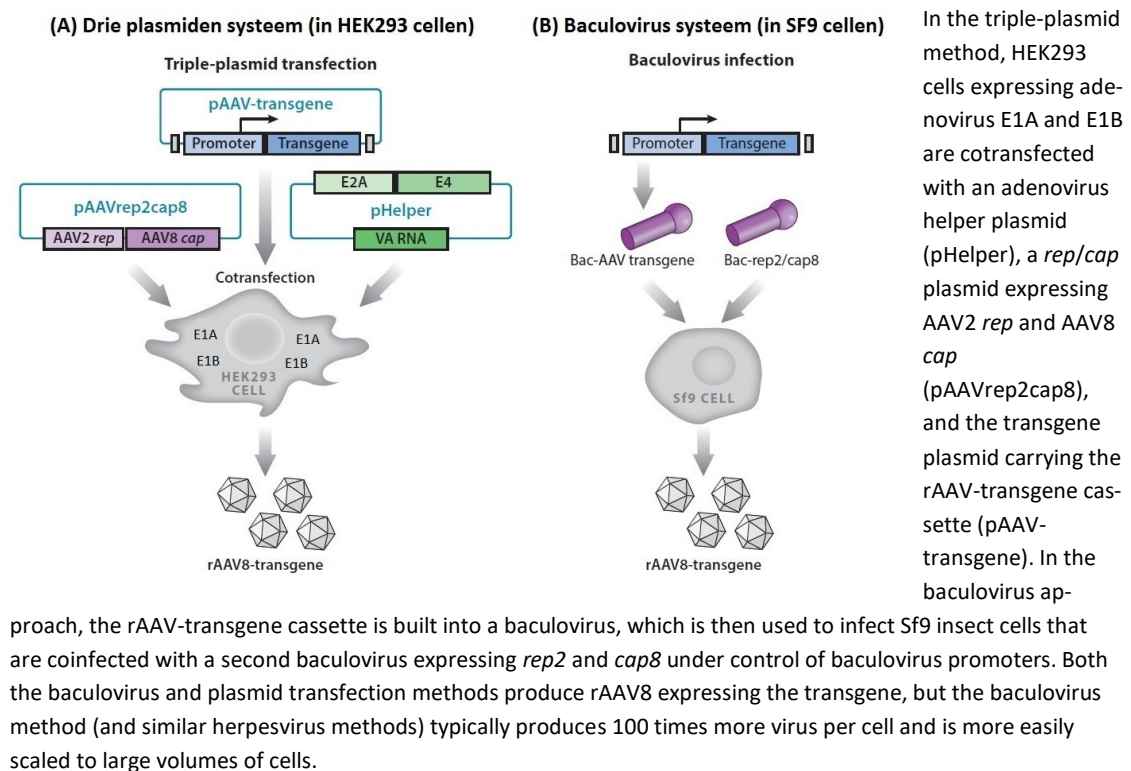
2.2 AAV-vectoren

2.2.1 AAV-vector productiesystemen

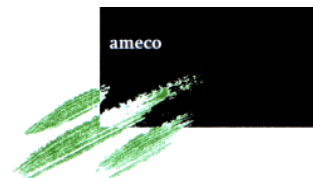
Aanvankelijk werden AAV-vectoren geproduceerd in systemen waarin nog betrekkelijk grote hoeveelheden helper adenovirus en replicatie-competent AAV werd gevormd. Deze systemen zijn niet meer in gebruik (voor een overzicht zie Hastie en Samulski (2015).

In de huidige productiesystemen (figuur 3A) voor AAV-vectoren worden cellijnen gebruikt waarin verschillende plasmiden worden getransfecteerd die met elkaar coderen voor de benodigde genen (Grimm et al., 1998; Grimm et al., 2003; Samulski en Muzyczka, 2014). Een plasmide draagt de genetische informatie voor de AAV-vector: de AAV ITRs, met daartussen de expressiecassette met het

Figuur 3 AAV productiesystemen (overgenomen uit Samulski en Muzyczka, 2014)



gewenste transgen. Een tweede plasmide draagt het *rep* gen, meestal AAV2 *rep*, en het *cap* gen van het gewenste serotype. Deze twee plasmiden dragen samen de AAV genen die nodig zijn voor de vorming van vectorpartikels. Daarnaast is er een aantal functies nodig die in een productieve AAV infectie geleverd worden door het helpervirus. Voor adenovirus als helpervirus zijn dat de E1A, E1B, E2A en E4 genproducten en een VA (virus associated) RNA (Matsushita et al., 1998). In de veelgebruikte HEK293 productiecellijn worden de E1A en E1B genproducten door de cel geproduceerd, de overige genen



worden in dat geval geleverd op het derde plasmide van het productiesysteem. In een dergelijk systeem worden AAV capsiden gevormd die vector DNA dragen, naast een hoeveelheid lege capsiden. Dong et al. (2013) wijzen erop dat er in deze systemen nog altijd rcAAV gevormd kan worden door niet-homologe recombinatie tussen *rep* en *cap* en de ITRs. Zij geven een proof of concept dat de vorming van rcAAV geheel kan worden tegengegaan door de AAV helpergenen in het cytoplasma te lokaliseren (op een cytoplasmatische virale vector) en de AAV-vector in de nucleus. De twee DNAs zijn dan geheel van elkaar te gescheiden, en niet-homologe recombinatie kan niet plaatsvinden. Deze methode wordt echter in de praktijk niet toegepast. Als er al geringe hoeveelheden rcAAV zouden kunnen worden gevormd in de gangbare systemen dan wordt dat niet gezien als leidend tot praktische problemen.

Grieger et al. (2016) geven een gedetailleerde beschrijving van 'scalable manufacturing processes that can efficiently generate high-titer, highly pure, and potent quantities of rAAV vectors'. Het proces is gebaseerd op een HEK293 cellijn die onder GMP kan worden gekweekt in suspensie in een bioreactor. 48 uur na transfectie van de cellen met de gewenste plasmiden bevat de cultuur $>1 \times 10^{14}$ virus genome containing particles (vg)/l ($>1 \times 10^5$ vg/cel). De vectoren kunnen worden gezuiverd via dichtheidsgradient centrifugatie en kolomchromatografie met een ionenwisselaar.

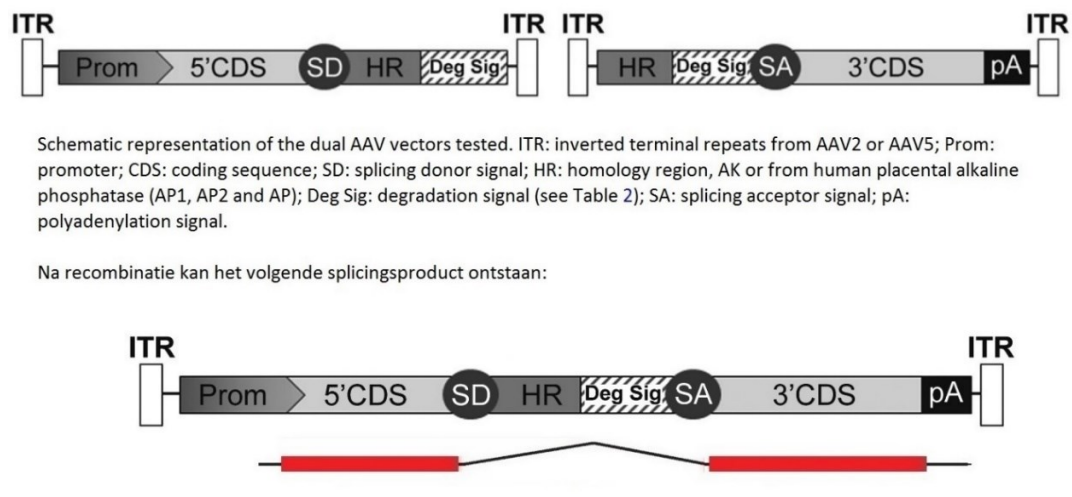
Voor grootschalige productie van AAV-vectoren wordt ook gebruik gemaakt van een baculovirus systeem in een Sf9 insectencellijnen (figuur 3B). Het baculovirus expressiesysteem maakt gebruik van de hoge en langdurige expressie van in baculovirus gekloneerde genen in insectencellijnen, zoals Sf9. De infectie van Sf9 met een baculovirus vector heeft een vergelijkbare werking voor de productie van AAV als de infectie met een helpervirus in een zoogdiercellijn (Virag et al., 2009). De precieze factoren die hierbij een rol spelen zijn onbekend (Samulski en Muzyczka, 2014). De optimalisatie van de grootschalige productie van AAV-vectoren met behulp van het baculovirus expressie systeem is gedetailleerd beschreven (Felberbaum, 2015).

Een probleem met AAV-vectoren is hun relatief geringe kloneringscapaciteit, die in de orde van grootte is van 5 kb (zie bijv. Trapani et al., 2015). De kloneringscapaciteit kan worden verhoogd door de coderende sequentie van het te kloneren gen te verdelen over twee vectoren in een dual vector systeem. Na co-transformatie van beide vectoren kan er door recombinatie een compleet gen worden gevormd. Een probleem van deze methode is de vorming van getrunkeerde N-terminale fragmenten van het genproduct. Dit probleem kan worden ondervangen door gebruik te maken van plasmiden waarin een degradatiesignaal is toegevoegd aan het 5' deel van het gen (Trapani et al., 2015; zie figuur 4). Dit degradatiesignaal wordt verwijderd bij de splicing. Het dual vector systeem vindt in de praktijk weinig toepassing.

2.2.2 Modificaties van capsid-eiwitten

De verschillende serotypen AAV capsiden hebben een verschillend *in vivo* tropisme (Srivastava, 2016; zie tabel 1). Er worden verschillende benaderingen gebruikt om nieuwe capsiden te krijgen, met

Figuur 4 Samenstelling dual AAV-vectoren (bewerkt naar Trapani et al., 2015)



combinaties van de eigenschappen van de al bekende capsiden, of met geheel nieuwe eigenschappen. Gebruikte benaderingen zijn mutagenese, bijvoorbeeld met error-prone PCR, screening met peptide display, waarbij op gerichte plaatsen in het capsid korte peptiden worden ingebracht, en het maken van chimere capsid-eiwitten met domain swapping/shuffling (Grimm en Zolothukin, 2015). Het is langs deze wegen relatief eenvoudig om een 'library' te maken van een groot aantal AAV capsid-eiwitten met verschillende eigenschappen en de mogelijkheden voor aanpassing van AAV capsid-eiwitten aan de eisen die gesteld worden lijken welhaast onbegrensd. Een probleem is om uit die veelheid van varianten die tegelijk worden gemaakt met de verschillende methoden, die eiwitten aan te wijzen die gunstige eigenschappen hebben voor gebruik als vector in humane gentherapie. Daartoe moet de vector library gescreend worden onder fysiologisch relevante omstandigheden. De beste benadering is waarschijnlijk het testen van de library in non-humane primaten (voor een discussie, zie Grimm en Zolothukin, 2015).

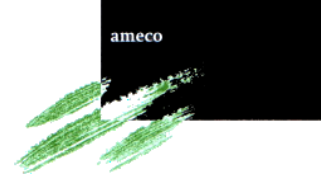
Modificaties van de capsid eiwitten zijn van belang voor de targeting van de vectorpartikels naar specifieke weefsels *in vivo*. Deze modificaties zijn pseudotyperingen: wanneer de vector eenmaal in een gastheer cel is aangekomen zal hij bij superinfectie door een wt AAV worden ingepakt in capsiden van het betreffende wt.

2.3 Elementen voor de milieurisicoanalyse van AAV-vectoren

In de volgende paragrafen wordt ingegaan op een aantal vragen die van belang zijn voor de milieurisicoanalyse van AAV-vectoren; in hoofdstuk 4 wordt verder ingegaan op de risicoanalyse.

De discussie betreft toepassingen van AAV-vectoren onder IG, in cellijnen, de toediening aan proefdieren, studies met proefdieren en studies met weefsels van proefdieren. Achtereenvolgens worden behandeld:

- De pathogeniteit van AAV en de biologische inperking van AAV-vectoren.
- De mogelijkheid van recombinitie en complementatie van AAV-vectoren en wt AAV.
- Persistentie van de vector na toediening aan een proefdier.



- De veiligheid van AAV-vectoren

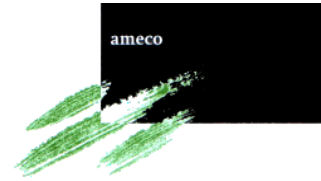
2.3.1 Pathogeniteit van AAV; biologische inperking van AAV-vectoren

AAV wordt algemeen gezien als een virus waaraan geen pathogene eigenschappen kunnen worden toegekend (paragraaf 2.1.2). Toch concluderen Dismuke et al. (2013) dat 'although wild-type AAV has not been associated with any disease and rAAV vectors have shown an excellent safety profile in a large number of animal studies and many clinical trials, it is advisable to use good laboratory and clinical practices to avoid any inadvertent exposure.' De werkplaats moet daarom worden gedesinfecteerd (bijv. 0,5% hypochloriet) en er moeten een veiligheidsbril, laboratoriumjas en handschoenen worden gedragen. Als contact met aerosolen kan ontstaan moet een masker worden gedragen. Er wordt echter geen onderbouwing gegeven waarom specifiek deze maatregelen noodzakelijk zouden zijn.

Over de infectie- en verspreidingsroute van AAV zijn geen wetenschappelijk onderbouwde gegevens beschikbaar. Algemeen wordt genoemd dat het virus wordt verspreid via aerosolen en blootstelling van slijmvlies aan druppeltjes, en langs orale weg. Daarnaast wordt de mogelijkheid van seksuele overdracht verondersteld. Het virus heeft een breed tropisme (tabel 1) en verschillende serotypen kunnen een groot aantal weefseltypen infecteren. Voor een productieve infectie is de aanwezigheid van een helpervirus vereist. AAV vertoont geen eigen specifieke cytopathische effecten naast de cytopathische effecten van het helpervirus; dit maakt het aantonen van het virus aan de hand van een cytopathisch effect onmogelijk (Mitchell et al., 2010). De NIH Guidelines (NIH, 2016) vermelden expliciet dat AAV tot risicoklasse 1 wordt gerekend.

De AAV-vectoren die nu in gebruik zijn, zijn 'guttet' (vergelijk paragraaf 3.2.3, over 'guttet' Ad-vectoren): zij missen de genetische informatie die nodig is voor een productieve infectie van de vector, of van wt AAV, en voor de plaatsspecifieke integratie in het genoom van de gastheercel onder invloed van het Rep eiwit. Het is daardoor uitgesloten dat een AAV-vector op zich een schadelijk effect zal hebben op een geïnfecteerde cel. De vectoren moeten worden beschouwd als volledig biologisch ingeperkt. Als de AAV-vector ook geen insert draagt dat codeert voor een schadelijk genproduct, dan zijn van de vector geen schadelijke effecten te verwachten in enig weefsel. Om die reden hoeft het verschil in tropisme tussen verschillende AAV serotypen niet in de veiligheidsdiscussie in beschouwing te worden genomen.

Het enige effect dat de vector zal hebben is dat zijn ssDNA zal worden omgezet in dsDNA, door het cellulaire DNA polymerase δ en de daarbij benodigde hulpeiwitten. Het DNA blijft episomaal in de cel aanwezig; in replicerende cellen wordt het vector DNA niet meegerepliceerd; de vector zal daardoor langzamerhand worden uitverdund uit een celculture en uit delende cellen *in vivo*. Kaepfel et al. (2013) hebben uitgebreide studies gedaan over de mogelijkheden van integratie van AAV1-LPL^{S447X} (Glybera) in het humane en het muizengenoom. De integratie gebeurt via een breuk en niet-homologe joining repair, vanaf een random plaats in de vector. Zij komen tot de conclusie dat de vector groten-deels random integreert in het genoom, maar dat er daarnaast een voorkeur is voor integratie in mitochondriaal DNA. Deze laatste gegevens worden overigens betwist (Cogné et al., 2014, en reactie van Kaepfel et al. aldaar).



2.3.2 Complementatie en recombinatie

AAV-vectoren zijn replicatie-defectief doordat het *rep* gen is gedeleteerd. Replicatie zal echter normaal verlopen als in een cel die met een AAV-vector is getransformeerd de *rep* genproducten beschikbaar komen. Een dergelijke complementatie kan gebeuren door superinfectie van de getransformeerde cel met replicatie-competent AAV. Bij de productie van AAV-vectoren zijn voorzorgen genomen dat er geen replicatie-competent AAV wordt gevormd door de ITRs op één plasmide te leggen en de *rep* en *cap* genen op een tweede plasmide zodanig dat deze elementen niet door een homologe recombinatie op één plasmide terecht kunnen komen (zie paragraaf 2.2.1.). Batches van AAV-vectoren die met dergelijke productiesystemen worden gemaakt zijn in principe vrij van replicatie-competent AAV. De kans op complementatie door dubbelinfectie van een cel met de AAV-vector en een in de vectorbatch aanwezig replicatie-competent AAV wordt op deze manier geminimaliseerd.

Na toediening van een AAV-vector aan een proefdier kan complementatie van *rep* en *cap* optreden als het proefdier geïnfecteerd is met wt AAV. Dat zal alleen leiden tot replicatie van de vector als het proefdier daarnaast is geïnfecteerd met een helpervirus, en indien een getransduceerde cel wordt geïnfecteerd met zowel wt AAV als met een helpervirus.

De mogelijkheid dat er ergens in het productieproces, of na de toediening van een AAV-vector aan een proefdier, replicatie-competent AAV worden gevormd dat een transgen draagt is uitgesloten. Als er al (niet-homologe) recombinatie plaats zal vinden waarbij de ITRs en de *rep* en *cap* genen worden samengebracht met een transgen, dan zal het resulterende DNA te groot zijn om in AAV partikels te worden ingepakt.

2.3.3 Persistentie van AAV-vectoren na toediening aan een proefdier

De expressie van de vector in getransduceerde cellen *in vivo* is stabiel over lange periodes (Bortolussi et al., 2014; Mattar et al., 2017). Sehara et al. (2017) konden de expressie van een transgen in een cynomolgus makaak nog aantonen 15 jaar na transductie van het putamen in de hersenen.

Brandon et al. (2010) geven een interessant overzicht van in de praktijk (kwalitatief) geconstateerde wegen van biodistributie en shedding van AAV2-vectoren. Zij constateren dat de weg van biodistributie en shedding afhangt van de wijze van toediening van de vector. Uit het door hen opgestelde overzicht kan worden opgemaakt dat in feite iedere toedieningsweg kan leiden tot systemische verspreiding van de vector, en tot shedding via feces, urine en andere lichaamsvloeistoffen. Salmon et al. (2014) geven een discussie over biodistributie en shedding voor de AAV-vector Glybera in klinische trials. Zij wijzen erop dat naast de toedieningsweg het tropisme van de betreffende vector de belangrijkste determinant is voor de biodistributie.

Ye et al. (2015, 2016b) toonden in een kwantitatieve studie bij makaken en muizen slechts een geringe verspreiding naar andere weefsels aan na subretinale toediening van een AAV2-vector. Bij toediening van $4 \cdot 10^{10}$ en $4 \cdot 10^{11}$ vg in het oog van makaken werd in het grootste deel van de monsters (119 van 144 monsters (82%), in 12 proefdieren) van verschillende weefsels geen vector DNA aangetoond. Waar DNA werd gevonden was dit een factor $10^3 - 10^6$ minder dan in de retina. In een studie met muizen werden vergelijkbare resultaten gevonden (Ye, 2016a). In shedding studies werden er zeer geringe

hoeveelheden vector DNA (max. 100 vg per monster) gevonden in feces, urine en traanvocht van een klein aantal proefdieren op dag 3 na de toediening. Op dag 8 waren alle dieren negatief.

Brandon et al. (2010) merken op dat de vergelijking van gegevens over biodistributie en shedding in verschillende publicaties niet eenvoudig is, doordat de omstandigheden van verschillende studies sterk verschillend zijn. Le Guiner et al. (2011) geven protocollen en overwegingen voor AAV shedding studies, en wijzen o.a. op de noodzaak van een rigide methodologie. Zo moeten de gevoeligheid, specificiteit en reproduceerbaarheid van de aantonningsmethode (meestal qPCR) voor verschillende soorten excreta afzonderlijk worden bepaald.

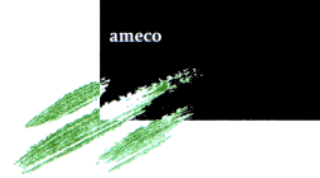
Bij de interpretatie van shedding gegevens moet in beschouwing worden genomen of de uitgescheiden vectoren nog wel infectieus zijn: Favre et al. (2001) hebben laten zien dat in niet-humane primaten alleen op dag 1 en 3 na de toediening infectieuze partikels worden gevonden onder de uitgescheiden AAV2-vectoren.

Ook bij vectorpartikels die in biodistributiestudies worden aangetoond is het de vraag of het gaat om partikels die infectieus zijn. Zo rapporteren Löw et al. (2013) dat bij injectie van AAV-vectoren in het centrale zenuwstelsel (de substantia nigra) het overgrote deel, > 98,5%, van de toegediende hoeveelheid vectorgenomen na 4 weken is verdwenen. Maar een deel (> 450 vectorgenomen/cel) blijft aanwezig als ssDNA in de cel. In de cel worden ook capsiden gevonden. Het is aannemelijk dat het ssDNA bestaat uit genomen die niet zijn vrijgekomen uit deze capsiden. Het gaat hier dus om in getransduceerde neuronen overgebleven vectorpartikels. Bij desintegratie van deze neuronen wordt geen infectie van naastliggende cellen waargenomen. Als dit resultaat ook maatgevend is voor transductie van andere weefsels dan kan ervan uit worden gegaan dat getransduceerde cellen en weefsels enige tijd na de toediening geen infectieuze vectorpartikels meer dragen, hoewel er wel vector DNA en capsiden kunnen worden aangetoond.

In de COGEM adviezen wordt het aantal in de bloedbaan circulerende AAV-vectorpartikels na toediening aan een proefdier gezien als een belangrijk criterium voor plaatsing in D-I. De klaring van circulerende AAV-partikels uit de bloedbaan wordt dan gemeten door het aantal vector genoomkopieën met qPCR te bepalen in het bloed. Doordat met deze methode alle AAV genomisch DNA wordt gemeten, ook naakt DNA en DNA in niet-infectieuze partikels, geeft het meetresultaat een worst-case inschatting van het daadwerkelijke aantal infectieuze vectordeeltjes.

De COGEM constateert echter ook ([CGM/161108-01](#)) dat 'de halfwaardetijd van bepaalde AAV serotypen in het bloed niet eenduidig is en afhankelijk van verschillende factoren'. Er is dan ook geen duidelijke consensus over de halfwaardetijden van AAV-partikels in het bloed, wat wordt geïllustreerd door de volgende voorbeelden.

Kotchey et al. (2011) hebben de klaring uit bloed bestudeerd na intraveneuze toediening bij muizen. Zij wijzen op het bi-fasische karakter van de klaringcurves van AAV uit de bloedbaan. De halfwaardetijd van de vector varieert van 0,2 tot 3,4 uur in de eerste 30 minuten. De daarna overblijvende vectorpartikels worden langzamer geklaard, met een halfwaardetijd variërend van 1,4 tot 29,7 uur. De halfwaardetijden verschillen sterk voor verschillende serotypen (AAV1, 2, 8, 9) maar ook tussen verschillende (gepseudotypeerde) AAV9 vectoren bestaan grote verschillen. De beperkende factor voor de



klaring zou hier liggen in de mogelijkheid van de vector om door het bloedvatpitheel heen te dringen en in verschillende organen te worden opgenomen.

Van Gestel et al. (2014) geven verschillende halfwaardetijden voor verschillende serotypen: 0.55 u. (AAV1), 0.07 u. (AAV2), 1.67 u. (AAV5) en 11.40 u. (AAV8). Zij houden echter geen rekening met een bifasisch karakter van de klaringscurves.

Ook Zincarelli et al. (2008) zien dat de snelheid van de klaring verschilt per serotype. De verschillen zijn echter gering: een factor 10 na 48 uur (resterende AAV-vectoren variëren tussen $1,66 \times 10^7$ en $1,44 \times 10^8$, een inactiveringsfactor van $1,6 \times 10^{-4}$ tot $1,4 \times 10^{-3}$).

Greig et al. (2016) zien bij veneuze toediening van een dosis van $\sim 5 \times 10^{13}$ AAV8-vectoren aan makaken ($7,5 \times 10^{12}$ per kg) na drie dagen geen AAV-partikels meer in het bloed. Na 24 uur bedraagt de hoeveelheid tussen 10^5 en 10^{10} per ml bloed.

Bij de toediening van een AAV-vector aan een proefdier kunnen voorzorgen worden genomen dat verspreiding van de vector door de vorming van aerosolen worden vermeden. In de meerderheid van de studies waarin naar shedding wordt gekeken wordt shedding in bijv. feces en urine aangetoond gedurende de eerste dagen na toediening, tot ongeveer een week. Langere perioden van shedding worden gemeld, maar het gaat dan om zeer geringe hoeveelheden. Zo zien Zabaleta et al. (2017) shedding van geringe hoeveelheden vector DNA (10^4 vg/ml) in o.a. feces en urine gedurende een periode van enkele weken.

Bij invasieve ingrepen in een proefdier na toediening van de vector kunnen er eventueel vectorpartikels vrijkomen. Het zal hier gaan om relatief geringe hoeveelheden van de vector.

Het infectierisico dat gepaard gaat met door shedding of langs andere weg vrijkomende AAV-vectorpartikels is zeer gering. Reuter et al. (2012) laten bijvoorbeeld zien dat er alleen op 24 uur na toediening van een AAV2-vector met een gekloneerd GFP gen nog infectieus virus werd aangetroffen op de injectieplaats. Bij dit experiment waren ook niet-geïnfecteerde muizen betrokken, die tussen de geïnfecteerde dieren verbleven, zgn. 'sentinel' dieren. Bij deze dieren werden geen AAV-vectoren aangetroffen, en er treedt dus geen kruiscontaminatie op.

Daarnaast is de transductie efficiëntie van AAV laag. Vergeleken met bijvoorbeeld een lentivirale vector is er voor een AAV2-vector een tenminste 100 maal hogere moi nodig om dezelfde transductie efficiëntie (50%) te halen (Chen et al., 2013; volgens Hoyng et al. (2015) is zelfs een 1000 – 5000 maal hogere moi nodig).

De conclusie ten aanzien van shedding van AAV-vectoren is dat shedding optreedt, maar in geringe mate en gedurende korte tijd (dagen tot twee weken) na toediening van de vector, en dat al na korte tijd geen infectieuze vectorpartikels meer worden uitgescheiden. Ook vectorpartikels die in het lichaam achterblijven worden geïnactiveerd.

2.3.4 Veiligheid van AAV-vectoren

In veel publicaties wordt erop gewezen dat AAV-vectoren veilig zijn gebleken in klinische trials. Srivastava en Carter (2017; de daar geciteerde website Gene Therapy Clinical Trials Worldwide⁶, vermeldt inmiddels 173 trials) halen 162 fase I/II en één fase III gentherapie trial aan, met gebruik van AAV1,

⁶ <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>

AAV2-, AAV5-, AAV8- en AAV9-vectoren, waarin geen adverse events zijn waargenomen. Een AAV1-vector waarin het LPL (lipoproteïne lipase) tot expressie wordt gebracht, bekend onder de naam Glybera (AAV1-LPL^{S447X}), is in de EU geregistreerd (EMA, 2012).

Er zijn vragen rond de immuunreacties die worden gezien bij toediening van AAV-vectoren aan de mens. Ertl en High (2017) geven een overzicht van de discussie. AAV-vectoren roepen bij toediening een reactie van het aangeboren immuunsysteem op, die betrekkelijk mild is. Er treedt ook een adaptieve respons op tegen de capside-eiwitten, die de effectiviteit van de transgen expressie verlaagt en uiteindelijk laat uitdoven. Deze respons kan negatieve gevolgen hebben voor de klinische bruikbaarheid van de vector, maar niet zozeer implicaties voor de bioveiligheid. De respons treedt vooral op bij toediening van hoge doses van de vector. De noodzakelijke dosis kan worden verlaagd als de transductiefrequentie wordt verhoogd (bijvoorbeeld door aanpassingen van het capside), of door verhoging van de expressie van het transgen (bijvoorbeeld door de transcriptie te verhogen).

3 Replicatie-defectieve Ad-vectoren

Dit hoofdstuk begint met een overzicht van de relevante eigenschappen van adenovirus: de taxonomie en de voorkomende serotypen, de pathogeniteitsklasse, en een moleculaire beschrijving van het virus. De paragraaf over replicatie-defectieve Ad-vectoren behandelt de 'eerste generatie' en 'tweede generatie' vectoren en de helper-dependent, 'guttet' vectoren. Vervolgens worden de gegevens over Ad-vectoren besproken die van belang zijn als elementen voor de risicoanalyse.

3.1 Overzicht Adenovirus

3.1.1 Taxonomie, serotypen

Er is een groot aantal adenovirussen geïsoleerd, uit verschillende gewervelde dieren (zoogdieren, vogels en vissen). Adenovirussen behoren tot de familie *Adenoviridae*⁷, met vijf genera: *Atadenovirus* (7 soorten), *Aviadenovirus* (12 soorten), *Ichtadenovirus* (1 soort), *Mastadenovirus* (36 soorten), *Siadenovirus* (6 soorten).

De humane adenovirussen horen tot de soort *human Mastadenovirus A-G*; er wordt een groot aantal serotypen of 'typen'⁸ onderscheiden, die verantwoordelijk zijn voor een aantal ziektebeelden. De meeste Ad-vectoren zijn afgeleid van types 2 en 5.

Tabel 2 Adenovirus typen en bijbehorende klinische symptomen (overgenomen uit Ghebremedhin, 2014)

HAdV subgroup	Serotype	Type of infection
A	12, 18, 31	gastrointestinal, respiratory, urinary
B, type 1	3, 7, 16, 21	keratoconjunctivitis, gastrointestinal, respiratory, urinary
B, type 2	11, 14, 34, 35	gastrointestinal, respiratory, urinary
C	1, 2, 5, 6	respiratory, gastrointestinal including hepatitis, urinary
D	8–10, 13, 15, 17, 19, 20, 22–30, 32, 33, 36–39, 42–49	keratoconjunctivitis, gastrointestinal
E	4	keratoconjunctivitis, respiratory
F	40, 41	gastrointestinal
G	52	gastrointestinal

⁷ ICTV: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>; zie daar onder de 'virus families not assigned to order', de familie *Adenoviridae*.

⁸ De bij de serotypering gebruikte (paarden)sera zijn kunstmatig opgewekt en zijn specifiek. De antilichamen die worden opgewekt bij een infectie vertonen vaak kruisreacties.

3.1.2 Pathogeniteitsklasse van adenovirus

Alle adenovirussen worden gerekend tot pathogeniteitsklasse 2 (zie de Regeling, paragraaf 4.1.1).

Voorbeelden van infecties waartoe adenovirus types leiden staan in tabel 2.

De COGEM heeft recent adviezen afgegeven over de inschaling van niet-humane adenovirussen, bijv. [CGM/170123-01](#), klassificatie van chimpansee adenovirussen en [CGM/161124-02](#), klassificatie van apen- en slangenadenovirussen. Ook deze adenovirussen worden tot klasse 2 gerekend.

De [Europese Richtlijn 2000/54/EC](#) rekent de *Adenoviridae* tot klasse 2.

3.1.3 Moleculaire beschrijving van adenovirus

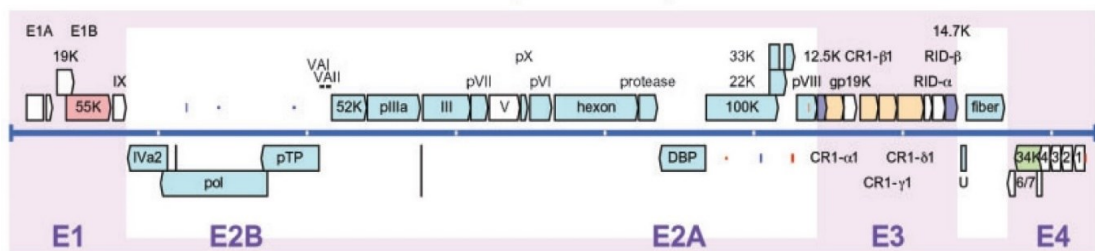
Adenoviruspartikels zijn opgebouwd uit een aantal capsid-eiwitten: hexon, penton, fiber, en een aantal minor capsid proteins, waaronder pIX.

Adenovirussen hebben een vergelijkbare genetische opbouw (Davison et al., 2003). Figuur 5 toont de genetische organisatie van humaan *Mastadenovirus E*.

Figuur 5 Genetische organisatie van human *Mastadenovirus E*

Overgenomen uit Davison et al., 2003.

Mastadenovirus: SAdV-25 (HAdV-E)

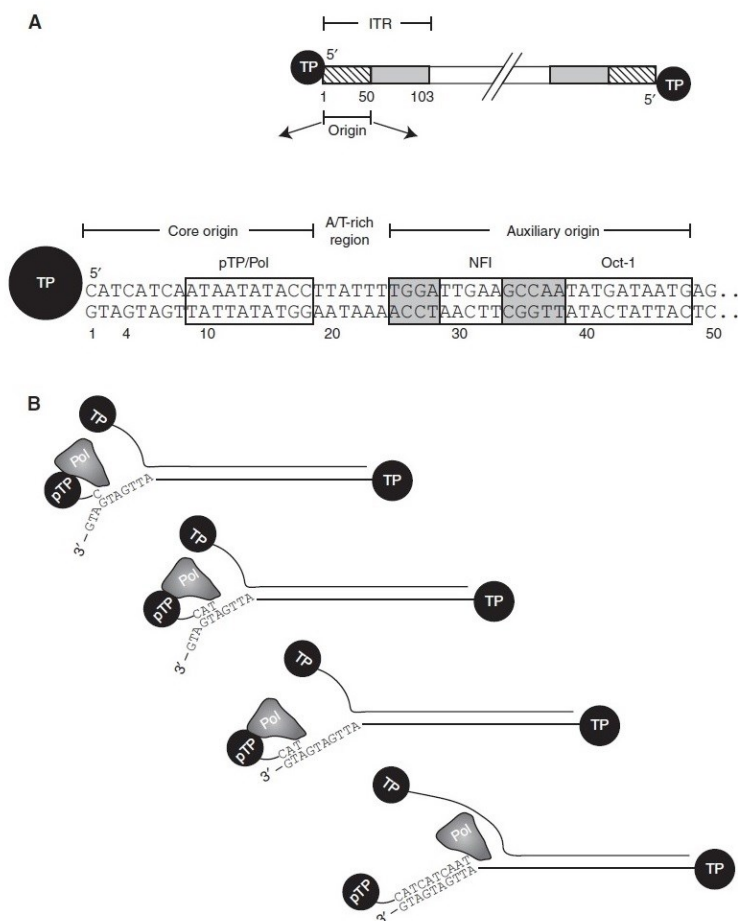


In de originele figuur van Davison et al. worden de genomen van *Mastadenovirus*, *Atadenovirus*, *Aviadenovirus* en *Siadenovirus* met elkaar vergeleken. Hier wordt alleen het Mastadenovirusgenoom getoond: 'Each genome is represented by a central blue horizontal line marked at 5 kbp intervals. Protein-encoding regions are shown as arrows. Cyan denotes genus-common genes, other colours indicate related genus-specific genes (E1B 55K and E4 34K are related between the Mastadenovirus and Atadenovirus genera), and genus-specific genes that lack relatives are white. E1 and E4 are marked in all genera and E3 in the Mastadenovirus and Siadenovirus genera, and these regions are shaded violet. E2A and E2B genes are present in all genera, and these regions are indicated for the Mastadenovirus genus [...].'

Op het genoom worden 'early' genen (gebieden E1 – E4) en 'late' genen (gebieden L1 – L5) onderscheiden, een packaging signal ψ en de inverted terminal repeats (ITRs; afgebeeld in figuur 7).

Beide ITRs functioneren als origin van replicatie. De replicatie start met de herkenning van de origin door pTP (precursor Terminal Protein); een serine residu in pTP dient als het OH uiteinde waaraan de eerste 5' C van het replicerende genoom wordt gebonden door het adenovirus DNA polymerase (Mysiak et al., 2004, Van der Vliet en Hoeben, 2006; Hoeben en Uil, 2013; figuur 6). Na synthese van

Figuur 6 Adenovirus replicatie (overgenomen uit Hoeben en Uil, 2013)



(A) Structure of the adenovirus type 5 origin and regions required for interaction with viral and cellular proteins. (B) Schematic representation of the initiation of DNA replication illustrating how the nucleotides 4–6 are used as a template for the formation of the pTP-CAT complex. The complex subsequently displaces to pair with nucleotides 1–3 of the template strand, after which the elongation continues.

de eerste CAT sequentie verplaatst het pTP- polymerase complex zich naar het uiteinde van het genoom. De DNA replicatie verloopt als een displacement synthese. Het resultaat is een dsDNA en een ssDNA genoom. De ssDNAs kunnen reannealen tot een ds genoom. Het pTP wordt in een laat stadium van de replicatie gekliefd tot het TP. Een adenovirusgenoom draagt dus aan beide 5' uiteinden een covalent gebonden TP.

pTP, DNA polymerase en het DNA binding protein, dat bindt aan de verplaatste DNA streng, zijn producten van de E2A en E2B regio's in het genoom. De expressie van de early genen wordt gereguleerd door het E1A genproduct. Replicatie van adenovirus kan dus alleen verlopen als de E2 gebieden tot expressie komen, onder invloed van het E1A genproduct.

Inpakken van het adenovirus genoom vindt plaats vanaf het packaging signaal ψ . Deze packaging leidt alleen tot een actief viruspartikel als de lengte van het genoom tussen een zekere minimale en maximale waarde is. De minimale lengte voor de DNA sequentie die nog kan worden ingepakt bedraagt 27,7 kb (Parks en Graham, 1997). De maximale lengte is in de orde van 37 kb; er wordt aangenomen dat bij het inpakken van een genoom met een lengte van meer dan 105% van het wt genoom, de gevormde viruspartikels instabiel zijn (Bett et al., 1993).

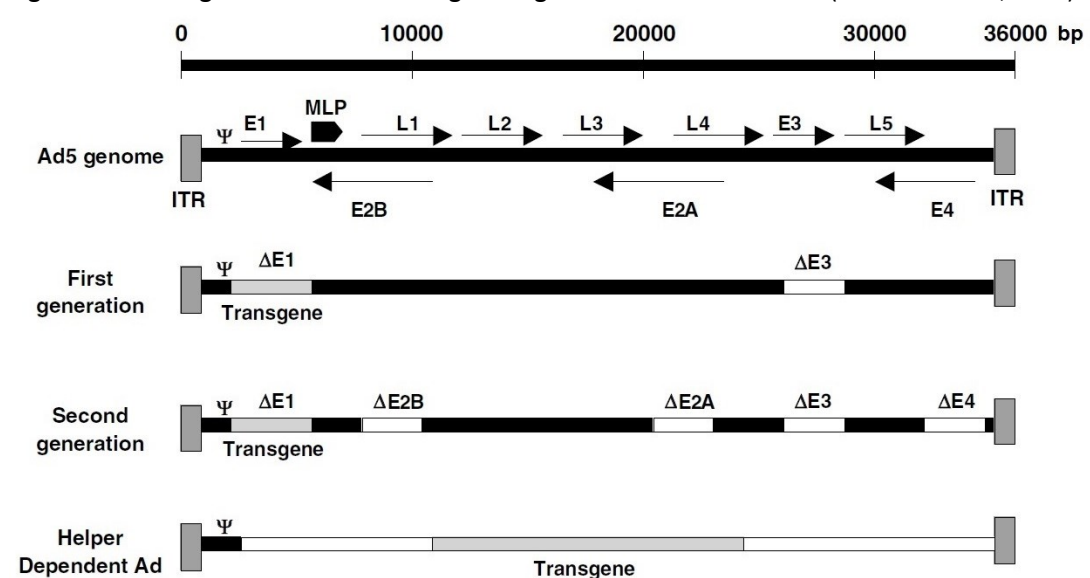
3.2 Replicatie-defectieve Ad-vectoren

3.2.1 'Eerste generatie' replicatie-defectieve Ad-vectoren

De term 'replicatie-defectieve' Ad-vectoren doelt op Ad-vectoren waarin een mutatie is aangebracht waardoor het virus niet langer kan repliceren onder omstandigheden waaronder het wt virus dat wel kan. De eerste replicatie-defectieve vectoren werden verkregen door het E1 gebied te deleteren uit het genoom van adenovirus type 5 ($\Delta E1$; Kovesdi en Hedley, 2010; figuur 7).

Bij de E1 deletie wordt ongeveer 3,2 kb aan DNA verwijderd uit het adenovirus genoom (Danthinne en Imperiale, 2000). Dit DNA kan worden vervangen door een expressie cassette waarin het te kloneren transgen is opgenomen. De maximale lengte van de expressie cassette wordt beperkt door de maximale lengte van het adenovirus genoom die kan worden ingepakt. Een $\Delta E1$ Ad-vector heeft daarmee een kloneringscapaciteit van zo'n 4 kb. Er kan meer 'ruimte' worden gemaakt op het genoom door ook het E3 gebied te deleteren. Het E3 gebied codeert voor genproducten die interfereren met de afweerreactie van de gastheer, maar die niet noodzakelijk zijn voor de replicatie van het adenovirusgenoom (Wold et al., 1993). De deletie vergroot de kloneringscapaciteit naar 8,1 kb.

Figuur 7 Het Ad5 genoom en daarvan afgeleide generaties virale vectoren (naar Alba et al., 2005)



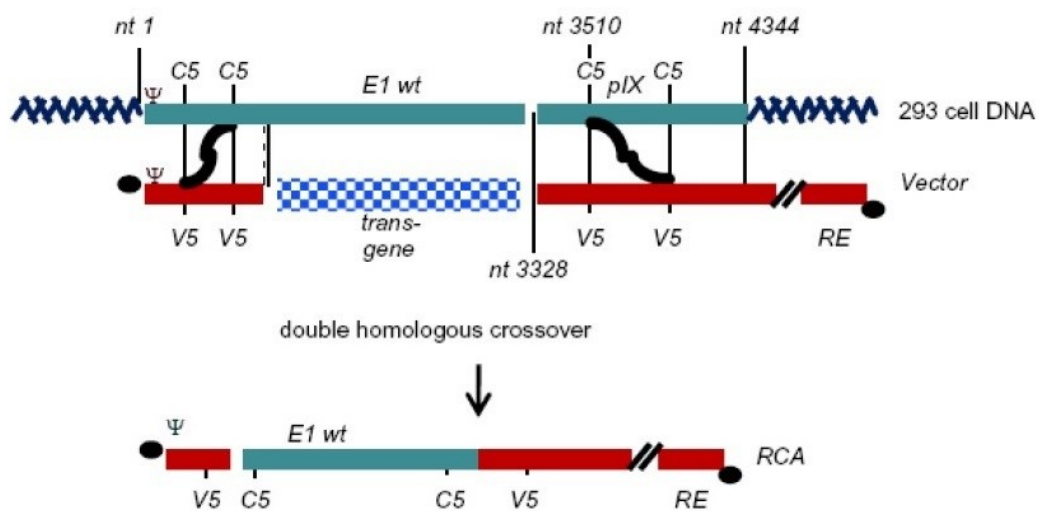
Map of adenovirus serotype 5 genome and different generations of adenoviral vectors. Early transcripts are represented by E1–E4 regions and late transcripts are represented by L1–L5 regions. MLP: major late promoter; C: packaging signal.

Voor de productie van eerste generatie Ad-vectoren moeten de vectoren worden gebracht in een cellijn waarin de E1 genproducten worden gecompenseerd. Complementatie van de E3 genproducten is niet noodzakelijk voor replicatie van de vector. Er is een aantal van dergelijke productiecellijnen beschikbaar waarin het E1 gebied aanwezig is en tot expressie komt (zie tabel 1 in Kovesdi en Hedley, 2010). Enkele veelgebruikte productiecellijnen worden hieronder besproken.

HEK293 (afgeleid van humane embryonale niercellen; Graham et al., 1977):

Deze productiecellijn draagt het E1 gebied vanaf nucleotide 1 tot 4344. Als het E1 gebied in de productiecellijn overlap heeft met het gebied rond de E1 deletie in de Ad-vector, dan is er een mogelijkheid dat recombinatie optreedt tussen de vector en het E1 gebied op het genoom van de productiecellijn (zie figuur 8). Bij deze recombinatie ontstaat er een replicatie-competent adenovirus (RCA). Maar de recombinatie zal ook leiden tot verlies van een transgen als dat is ingebouwd op de plaats van de $\Delta E1$ deletie. Het gevormde RCA draagt in dat geval dus geen transgen.

Figuur 8 Vorming van RCA in HEK293 cellen (naar Kovesdi en Hedley, 2010)



The complementary regions of Ad5 sequence in the vector and the HEK293 genome are aligned at the top of the figure. These regions allow for homologous recombination to occur and for the rescue of recombinant competent adenovirus.

911 (afgeleid van een humane embryonale retinoblast; Fallaux et al., 1996):

Deze cellijn, van andere herkomst dan HEK293, draagt een sequentie van het Ad5 genoom, van nucleotide 79-5789. Deze cellijn is ontwikkeld om betere productie van virale vectoren te bewerkstelligen. De cellijn vertoont het probleem van productie van RCA in vergelijkbare mate als HEK293.

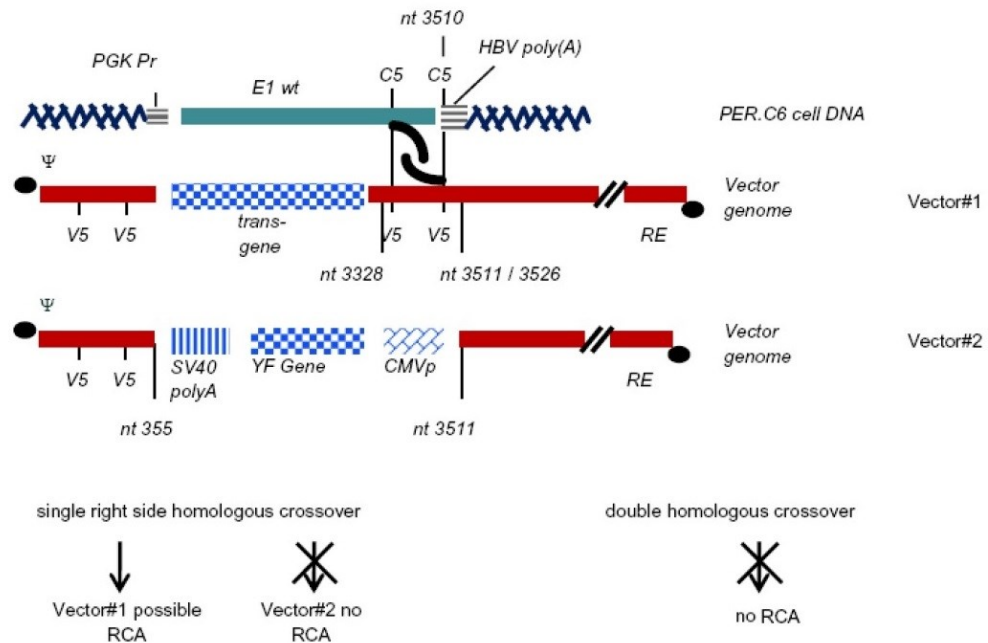
PER.C6 en vergelijkbare cellijnen

Bij de ontwikkeling van PER.C6 (eveneens afgeleid van een humane embryonale retinoblast, Fallaux et al., 1998) en de bijbehorende Ad-vector is gezorgd dat er geen overlap is tussen het E1 gebied in de cellijn en het gebied rond de $\Delta E1$ in de vector. Het E1 gebied in de cellijn is daartoe verder verkleind (nt 495-3510). De transcriptie vindt plaats vanaf een niet-adenovirale promotor; de poly A sequentie komt uit *Hepatitis B* virus.

De adenovirale sequentie in PER.C6 heeft (vrijwel) geen homologie met de meeste $\Delta E1$ Ad-vectoren. Echter, de aanwezigheid van een (zelfs maar kleine) homologe sequentie aan de rechter kant van de

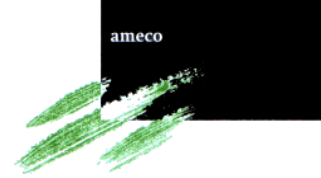
deletie kan leiden tot de vorming van 'atypische' RCA (zie figuur 9). Maar als er in het geheel geen homologie is tussen de vector en de in PER.C6 (of andere vergelijkbare productiecellijnen) aanwezige adenovirale sequenties, dan is vorming van RCA via homologe recombinatie geheel uitgesloten.

Figuur 9 (On)mogelijkheid tot vorming van RCA in PER.C6 (naar Kovessdi en Hedley, 2010)



Effect of vector design on RCA free production in PER.C6 cell line. In Vector #1 there is a short stretch of homology with the PER.C6 Ad5 sequence that allows homologous recombination. This results in atypical RCA. When the vector has no homology (Vector #2) no homologous recombination occurs and the viral production is RCA free.

In PER.C6 is de E1 sequentie van Ad5 aanwezig van nt 459-3510. Dezelfde sequentie is aanwezig in de UR cellijn, een humane embryonale longcellijn (Xu et al., 2006). In deze cellijn wordt na 10 generaties productie met een Δ E1 gedeleteerde Ad-vector zonder homologie aan de rechterzijde geen RCA gevonden. In de 293cellijn wordt met dezelfde vector al na 4 generaties RCA gevonden. In de cellijn GH329 (afgeleid van de HeLa cellijn, Gao et al., 2000) is de E1 sequentie aanwezig van nt 511-3924. Een batch van een vector met een Δ E1 zonder overlap geproduceerd op deze cellijn bevatte na 20 generaties nog geen RCA. Schiedner et al. (2000) beschrijven een humane primaire amniocyten cellijn (N52.E6) met het E1 gebied van nt 505-3522 waarin met een vector zonder overlap in het E1 gebied eveneens geen RCA wordt gevonden. Er bestaat daarmee consensus dat in een productiesysteem waarin het E1 gebied in de productiecellijn geen enkele overlap vertoont met de E1 deletie in de vector, vorming van RCA door homologe recombinatie uitgesloten is. Het gebrek aan overlap moet wel zorgvuldig worden gecontroleerd. Er is één geval gepubliceerd (Murakami, 2002) waarin een geringe mate van overlap tussen vector en productiecellijn leidde tot 'aberrant' recombinatie die resulteerde in recombinant vectoren met het E1 gebied en tevens de transgenen. Uit deze recombinanten werden door deletie van adenovirale genen helper afhankelijke recombinant vectoren gevormd.



De combinatie van een $\Delta E1$ met een $\Delta E2A$, $\Delta E2B$ of $\Delta E4$ in het vectorgenoom leidt tot replicatie-defectieve vector die niet replicatie competent wordt door alleen een recombinatie die het E1 gebied terugbrengt in de vector. Voor dit type vectoren gelden overeenkomstige overwegingen voor de combinatie van de adenovirus sequenties in de productiecellijn en de deleties op het vectorgenoom: als er geen overlap is tussen de E2A, E2B of E4 sequenties in de productiecellijn en de sequenties rond de overeenkomstige deleties in de vector zal er ook geen RCA worden gevormd.

De conclusie dat in een vectorproductiesysteem geen RCA gevormd kan worden als er geen overlap is tussen de gedeleteerde sequenties in de vector en de gekloneerde adenovirus sequenties in het genoom is een belangrijk element in de risicoanalyse. De omvang van de verschillende sequenties zouden daarom met behulp van DNA sequencing bepaald moeten worden. Deze bepaling kan voor de productiecellijn eenmalig gebeuren, en hoeft niet voor nieuwe combinaties van dezelfde cellijn met andere vectoren herhaald te worden. De identiteit van de productiecellijn moet wel gegarandeerd kunnen worden.

Een punt van discussie bij de productie van eerste generatie Ad-vectoren is de noodzaak van aanwezigheid van protein IX (pIX). pIX is een 'minor capsid protein', dat nodig is voor de vorming van een robuust, thermotolerant, capsid. Het eiwit speelt ook een rol bij de transductie en de bepaling van het tropisme (De Vrij et al., 2011). Het pIX gen ligt in het 3' terminale deel van het E1 gebied, en is bijvoorbeeld gedeleteerd in PER.C6. Wanneer het ook niet aanwezig is op de vector dan kan het *in trans* worden gecomplementeerd, maar daarbij moet overlap tussen de vector en de productiecellijn worden vermeden.

Een manier om het optreden van homologe recombinatie tussen het E1 gebied in de productiecellijn en de vector te voorkomen is de inbouw van het E1A en het E1B gen op verschillende plaatsen in het genoom, waardoor homologe recombinatie wordt uitgesloten. Zo gebruikten Farson et al. (2006) retrovirale vectoren voor de insertie van E1A en E1B op verschillende locaties in het genoom. Howe et al. (2006) gebruikten plasmiden voor de afzonderlijke insertie van E1A en E1B.

Een andere manier om de vorming van replicatie-competente viruspartikels tegen te gaan is om het transgen op een andere plaats in de Ad-vector in te bouwen dan in het E1 gebied, bijvoorbeeld in het E3 gebied (Suzuki et al., 2011). Bij uitwisseling van de $\Delta E1$ tegen het E1 gebied aanwezig in de productiecellijn ontstaat een adenovirusgenoom dat, als de insertie in het E3 gebied groot genoeg is, te groot zal zijn voor packaging in viruspartikels.

3.2.2 'Tweede generatie' replicatie-defectieve Ad-vectoren

In tweede generatie Ad-vectoren zijn naast het E1 gebied, en desgewenst het E3 gebied, ook de E2A, E2B en/of het E4 gebied gedeleteerd (zie bijv. Gorziglia et al., 1999). Hierdoor wordt de coderende capaciteit verder verhoogd. Productie van deze vectoren gebeurt in cellijnen die de gedeleteerde functies complementeren (zie tabel 3). De verschillende gedeleteerde gebieden coderen voor: E2A: het ssDNA bindende eiwit; E2B: DNA polymerase en het terminal precursor protein; E4: regulatie eiwitten voor de expressie van late genen.

Tabel 3 Productiecellijnen voor tweede generatie Ad-vectoren
(naar Kovesdi en Hedley, 2010)

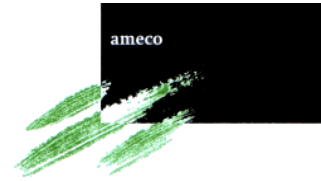
Cell Line	Parental Cells	E2 or E4 Complementation	Viral Products
VL2-20 and VK10-9	HEK293	E4	All ORFs
293-E4	HEK293	E4	All ORFs
C7	LP-293	E2B	Pol and pTP
293-ORF6	HEK293	E4	ORF6
MT-ORF6	HEK293	E4	ORF6
MMTV-ORF6	HEK293	E4	ORF6
AE1-2a	A549	E2A	DBP
293-pTP	HEK293	E2B	pTP
IGRP2	HEK293	E4	ORF6 and 7
293-C2	HEK293	E2A	DBP
911E4	911	E4	All ORFs
293-E2A	HEK293	E2A	DBP
293-E4	HEK293	E4	All ORFs
293-E4ORF6+7	HEK293	E4	ORF6 and 7
A70.S54	AE1-2a	E2A/E4	DBP/All ORF
E2T	HEK293	E2A	DBP

Deze cellijnen zijn afgeleid van cellijnen die E1A en E1B tot expressie brengen.

Tweede generatie Ad-vectoren bieden het voordeel dat er meer ruimte is in de vector voor grotere inserties zonder dat de maximale lengte van een adenovirus genoom wordt overschreden. Een tweede belangrijk voordeel is dat de 'leaky' expressie van adenovirusgenen die bij eerste generatie vectoren nog voorkomt sterk gereduceerd is. Leaky expression leidt tot mogelijk toxische effecten en tot een immuunreactie tegen de getransformeerde cellen (Romano, 2006). Deze immuunreactie limiteert de expressie van transgenen in getransduceerde cellen *in vivo* in tijd. Doordat leaky expressie niet of veel minder optreedt bij tweede generatie Ad-vectoren, is de *in vivo* effectiviteit van transductie met deze vectoren hoger dan die van eerste generatie vectoren.

3.2.3 Helper afhankelijk (HD) Ad-vectoren

In helper afhankelijke Ad-vectoren ('high capacity', 'gutted' of 'gutless' Ad-vectoren) zijn alleen de ITRs en ψ , het signaal dat in cis nodig is voor de packaging, afkomstig van adenovirus. Het vectorgenoom



moet worden aangevuld tot een lengte tussen 27,7 en 36 kb (Alba et al., 2005), de minimale en maximale lengte die kan worden ingepakt in een adenovirus partikel. De vector kan worden aangevuld met de expressiecassette(s) van het/de gewenste transgen(en) en, zo nodig, niet-coderend 'stuffer' DNA. Een productiecellijn voor HD Ad-vectoren (Alba et al., 2005; Palmer en Ng, 2003; Cots et al., 2013) moet naast de vector alle genen van adenovirus tot expressie brengen. Voor een aantal adenovirus genproducten geldt dat constitutieve expressie leidt tot cytotoxische effecten (Schiedner et al., 1998, Alba et al., 2005). De adenovirale genen kunnen daarom het best in de productiecellijn tot expressie worden gebracht door co-infectie met een complementender adenovirus. Als hiervoor gebruik wordt gemaakt van een E1 gedeleteerd adenovirus en een cellijn die het E1 gebied van adenovirus tot expressie brengt (zie paragraaf 2.2.3), dan wordt de vorming van RCA geminimaliseerd.

Er moet worden voorkomen dat genomen van het helpervirus, die tijdens de productie in de cellijn aanwezig zijn, worden ingepakt in adenovirus partikels en daarna als verontreiniging aanwezig zijn in batches van de HD Ad-vector. Packaging van het helpervirus in de productiecellijn kan worden beperkt door het packaging signaal ψ te verwijderen uit het helpervirus, nadat het de productiecel heeft geïnfecteerd. Dat kan gebeuren door een site specific recombinatiesysteem; meestal wordt daarvoor het Cre-*loxP* systeem gebruikt. In het helpervirus worden *loxP* sites, de aangrijpingsplaats van het Cre recombinase, aangebracht aan weerszijden van ψ . In een productiecellijn die Cre recombinase tot expressie brengt zal ψ door recombinatie van de *loxP* sites worden verwijderd. In de praktijk blijft er toch een zekere hoeveelheid helpervirus aanwezig dat een ψ signaal draagt (in de orde van 0,1%). Er worden verschillende strategieën gevolgd om de hoeveelheid ψ signaal dragend helpervirus te beperken (Palmer en Ng, 2003; Cots et al., 2013). Het voorkomen, of tegengaan, van recombinatie tussen de HD vector en het helpervirus waardoor het helpervirus het eerder verwijderde ψ signaal terug kan krijgen, blijkt in de praktijk te voorkomen dat het helpervirus wordt ingepakt (Ng et al., 2002). Een haalbare zuiverheid is 0,02-0,01% helperviruspartikels bij een opbrengst van 10^{13} HD Ad-vectorpartikels. Zoals hierboven is aangegeven is het gebruikte helpervirus E1 gedeleteerd, zodat de verontreinigende helpervirussen replicatie defectief zijn.

3.2.4 Modificaties van capside eiwitten; hybride vectoren

De volgende paragrafen behandelen verschillende manieren waarlangs wordt geprobeerd om de eigenschappen van Ad-vectorpartikels aan te passen door modificaties van het capside.

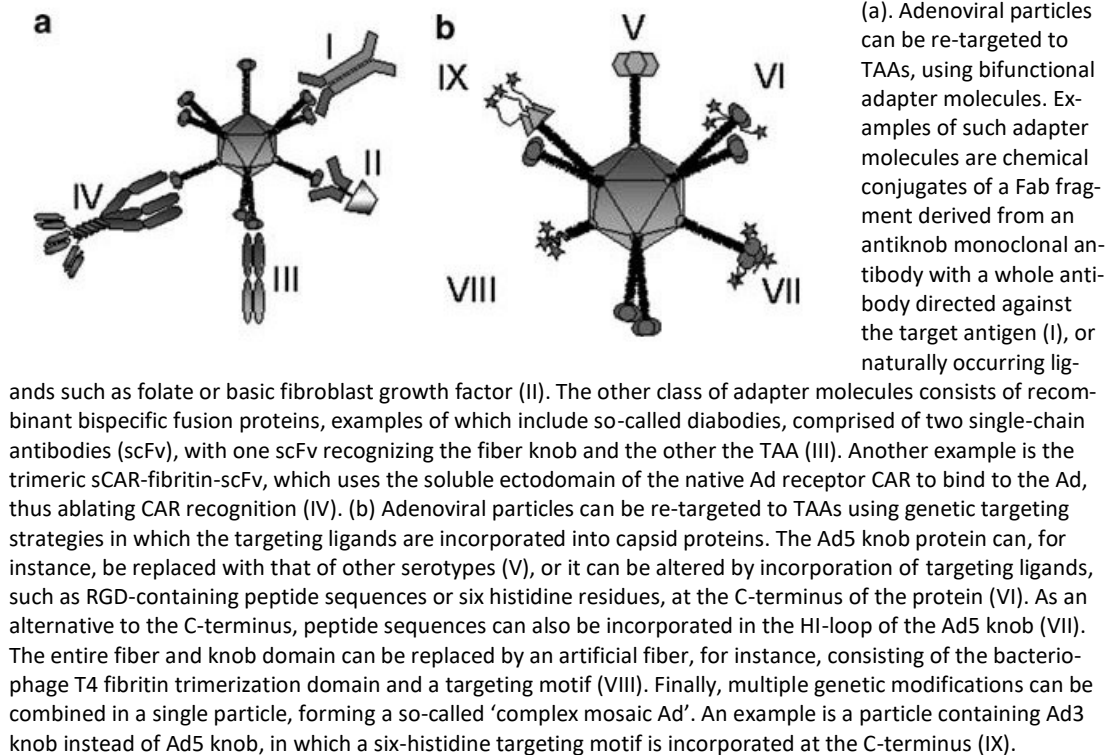
Die modificaties kunnen worden toegepast op het vectorpartikel, of kunnen genetisch worden vastgelegd op het vectorgenoom.

3.2.4.1 Genetische en niet-genetische aanpassingen van het capside van de vector

Om de toegediende vector te beschermen tegen inactiverende antilichamen van de ontvanger of tegen immunologische reacties in de gastheer, kan de vector fysiek gemaskeerd worden. Een succesvolle manier is het toevoegen van polyethyleenglycol (PEG) aan de vector (O'Riordan et al., 2004). Deze 'PEGylation' beschermt ook tegen de toxische reactie van het aangeboren immuunsysteem.

De eigenschappen van een vector kunnen ook worden gemodificeerd door binding van moleculen aan het capside. Deze binding kan plaatsvinden op een niet-covalente wijze door middel van adaptermoleculen (figuur 10a). Een voorbeeld is het gebruik van verschillende bi-functionele adaptor moleculen,

Figuur 10 Voorbeelden van modificaties van capsid eiwitten
(overgenomen uit Glasgow et al., 2006)



waarmee een Ad-vectorpartikel getarget kan worden naar cellen die specifieke tumor-geassocieerde antigenen (TAA) tot expressie brengen (Glasgow et al., 2006).

Het capsid kan ook worden gemodificeerd door genetische veranderingen van genen die coderen voor capsid-eiwitten (Glasgow et al., 2006, zie ook Kurachi et al., 2007). Figuur 10b geeft een aantal mogelijkheden voor modificatie van de knob, bijvoorbeeld door het inbouwen van een ligand zoals het RGD motief. Daarnaast wordt gewerkt aan de modificatie van andere capsid eiwitten. Zo heeft het hexon eiwit, naast een aantal delen die sterk geconserveerd zijn in de humane types, ook een aantal hypervariabele regio's (HVRs) die kunnen worden gemodificeerd zonder dat de functie van het hexon in het capsid wordt aangetast. Een voorbeeld zijn modificaties van de hexon HVRs om binding van bloed stollingsfactoren te verminderen (Factor X) zodat er verminderde opname van de vector in de lever plaatsvindt (Waddington et al., 2008). Protein IX kan worden gebruikt om er ligand peptiden aan te koppelen, en zelfs betrekkelijk grote peptiden aan te koppelen, zoals GFP.

3.2.4.2 Vectoren afgeleid van verschillende typen adenovirussen

Doordat een groot deel van de humane populatie al in de jeugd jaren is blootgesteld aan verschillende typen adenovirussen (met name typen 2, 4, 5 en 7) is er een hoog percentage individuen met een middelmatig tot hoge titer aan adenovirus-specifieke antilichamen (in de VS bijvoorbeeld 30-50%; Seregin

en Amalfitano, 2009). Deze bestaande immuniteit lijkt in veel gevallen de effectiviteit van behandelingen met vectoren afgeleid van deze typen te belemmeren (Ad5-vectoren worden het meest gebruikt), al lijkt het erop dat de aanwezigheid van anti-adenovirus antilichamen ook de effectiviteit van de vector kan verhogen, bij gebruik van adenovirale vectoren voor tumorbehandeling.

Er is een groot aantal typen bekend van adenovirussen die niet (vaak) bij de mens voorkomen. Tegen deze adenovirussen zal geen of een veel mindere mate van immuniteit bestaan. Vectoren afgeleid van deze typen adenovirussen zullen daardoor minder belemmerd worden in hun effectiviteit. Van deze typen kunnen replicatie-defectieve vectoren worden afgeleid door, vergelijkbaar met de eerste generatie Ad-vectoren, het E1 gebied te verwijderen (zie paragraaf 3.2.1).

Er worden experimenten gedaan, waarbij hexon eiwitten en fibers van verschillende genera en typen worden uitgewisseld (zie bijvoorbeeld het COGEM advies [CGM/161124-02](#)). De effectiviteit van dergelijke uitwisselingen moet nog verder worden onderzocht.

3.2.4.3 Versnelde evolutie van adenovirale vectoren

Wijzigingen in de eigenschappen van het capside kunnen gericht worden aangebracht, bijvoorbeeld door genetische modificatie. Zo'n gerichte aanpak vereist kennis van de functies en interacties van adenovirus. Capside-eiwitten kunnen ook random worden gemodificeerd, bijvoorbeeld door het gebruik van een adenovirus met een gemodificeerd DNA polymerase dat met verhoogde frequentie mutaties introduceert (Uil et al., 2011). Uit de verkregen mutanten kunnen vectoren met een specifieke gewenste eigenschap worden geselecteerd op basis van hun fenotype.

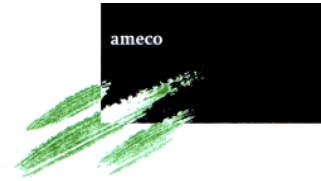
3.3. Elementen voor de risicoanalyse van replicatie-defectieve Ad-vectoren

In de volgende paragrafen wordt ingegaan op een aantal vragen die van belang zijn voor de milieurijsicoanalyse van Ad-vectoren; in hoofdstuk 4 wordt verder ingegaan op de risicoanalyse. De discussie betreft toepassingen van Ad-vectoren onder IG, in cellijnen, de toediening aan proefdieren, studies met proefdieren en studies met weefsels van proefdieren. Achtereenvolgens worden behandeld:

- De pathogeniteit van adenovirus en de pathogeniteit en biologische inperking van Ad-vectoren.
- De mogelijkheid van recombinatie en complementatie van Ad-vectoren en wt adenovirus.
- Persistentie van de vector na toediening aan een proefdier.
- Veiligheid van Ad-vectoren.

3.3.1 Pathogeniteit van adenovirus en Ad-vectoren; biologische inperking van Ad-vectoren

Adenovirussen (alle genera, zie paragraaf 3.1.1) worden gerekend tot pathogeniteitsklasse 2. De COGEM heeft geadviseerd ([CGM/161124-02](#)) dat deze pathogeniteitsklassering ook geldt voor hybride adenovirussen (ook hybriden van verschillende genera) die zijn ontstaan door uitwisseling ('swapping') van bestaande adenoviruselementen.



Replicatie-defectieve Ad-vectoren zijn infectieus, maar doordat zij na de infectie niet repliceren blijft hun werking beperkt tot de eerste cellen die worden geïnfecteerd. Na infectie blijft een replicatie-defectieve Ad-vector als betrekkelijk inert DNA in de cel aanwezig. Er vindt slechts een lage ('leaky') expressie plaats van de adenovirale genen (Romano, 2006), waardoor in sommige gevallen de getransduceerde cellen een immuunreactie opwekken. Dit kan een toxische werking hebben. Bij een dergelijke reactie worden de getransduceerde cellen door de immuunreactie opgeruimd, wat resulteert in een slechts tijdelijke expressie van de in de vector gekloneerde genen. Dit geldt in mindere mate voor vectoren waarin de E2 gebieden zijn gedeleteerd. Helper afhankelijke Ad-vectoren, die geen coderende sequenties meer dragen voor adenovirale eiwitten, zullen geen toxiciteit vertonen op basis van expressie van adenovirus eiwitten. Vanuit het oogpunt van bioveiligheid is de beperkte levensduur van de getransduceerde cellen geen probleem.

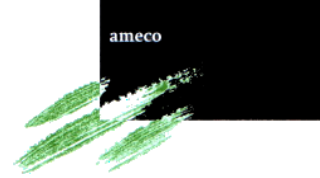
De biologische inperking van replicatie-defectieve adenovirale vectoren berust op de afwezigheid van genproducten die nodig zijn voor de replicatie. Nadat een vector een cel heeft geïnfecteerd zal geen replicatie plaatsvinden. Een vector kan worden gemobiliseerd wanneer de gemuteerde (gedeleteerde) functies van de vector worden gecompenseerd door de overeenkomstige functies van een replicatie-competent adenovirus (RCA) dat gelijktijdig in de vector dragende cel aanwezig is. De kans op gelijktijdige aanwezigheid van de vector en een RCA is groot als de vector batch RCA bevat. Er worden daarom eisen gesteld aan de afwezigheid van RCA in klinische batches van adenovirale vectoren⁹. Vectoren van één serotype kunnen worden gemobiliseerd door wt adenovirussen van een ander serotype (Rademaker et al., 2002). Het is niet duidelijk in hoeverre de daarbij gevormde Ad-vectoren gepseudotypeerd zijn met capside eiwitten van het wt virus, of de capside eiwitten dragen die door het vector genoom worden gecodeerd. Onder omstandigheden van ingeperkt gebruik zal mobilisatie van een vector alleen kunnen optreden wanneer

- met de vector geïnfecteerde cellen worden blootgesteld aan wt adenovirus, dan wel
- een met de vector geïnfecteerd proefdier een adenovirale infectie draagt.

3.3.2 Vorming van RCA en replicatie-competente vectoren

Bij de productie van eerste generatie Ad-vectoren kan replicatie-competent adenovirus worden gevormd door recombinatie (via een dubbel-cross over) tussen het E1 gebied dat aanwezig is in de productiecellijn en het resterende E1 gebied in de vector (zie figuren 7 en 8). Een dergelijke recombinatie is alleen mogelijk als er overlap is tussen het DNA in het E1 gebied van de vector en het in de productiecel aanwezige E1 DNA. Deze recombinatie kan ook optreden bij tweede generatie Ad-vectoren, maar of dat leidt tot een RCA is afhankelijk van de overige genen die in de vector zijn gedeleteerd en de mogelijkheid om die genen via recombinatie met een wt adenovirus weer terug te krijgen.

⁹ Een batch van een adenovirale vector mag slechts geringe hoeveelheden replicatie competent adenovirus (RCA) bevatten. De FDA raadt een bovengrens aan van 1 RCA in 3×10^{10} viral particles: '[Guidance for FDA Reviewers and Sponsors](#)' (: Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)' (geciteerd in een FDAGuidance for Industry (2015): [Determining the Need for and Content of Environmental Assessments for Gene Therapies, Vectored Vaccines, and Related Recombinant Viral or Microbial Products](#)). (Zie ook [FDA Cellular & Gene Therapy Guidances](#).)



Bij de productie van HD Ad-vectoren (paragraaf 3.2.3) wordt gebruik gemaakt van een helpervirus dat replicatie-competent is, maar niet ingepakt kan worden nadat het zijn packaging signaal heeft verloren. In paragraaf 3.2.3 is bediscussieerd dat het in de praktijk niet mogelijk is om het ontstaan van helperviruspartikels geheel te voorkomen.

De mogelijkheid van vorming van RCA dat een transgen draagt is afhankelijk van de packaging capaciteit van het adenovirus capsid.

RCA dat gevormd wordt door de dubbel-cross over in een eerste generatie Ad-vector draagt geen transgen dat geïnserteerd is in de E1 deletie van de vector. Maar als het transgen elders in het vector-genoom is geïnserteerd, bijvoorbeeld op de plaats van een gedeleteerd E3 gen, dan zal het afhangen van de omvang van het transgen of het resulterende RCA genoom ingepakt kan worden. Bij een tweede generatie vector gelden vergelijkbare overwegingen. Bij HD Ad-vectoren is de mogelijkheid van ontstaan door homologe recombinatie van een RCA dat een transgen draagt, effectief uitgesloten.

3.3.3 Persistentie van Ad-vectoren na toediening aan een proefdier

Tiesjema et al. (2010) geven een uitgebreid overzicht van gegevens over biodistributie en shedding van Ad5-vectoren na toediening langs verschillende wegen, in proefdieren en in de mens. De conclusie van deze auteurs is dat gegevens uit verschillende studies lastig vergelijkbaar zijn. De manier waarop de titers van de gebruikte vector stocks zijn bepaald verschillen, evenals de analysetechnieken waarmee de resultaten zijn verkregen, de detectielimieten en de tijdstippen van monstername. In slechts 25% van de gevallen is gebruik gemaakt van een analysetechniek waarmee infectieuze vectorpartikels worden aangetoond. Zij beperken zich daarom tot een kwalitatieve analyse en concluderen dat de biodistributie afhankelijk is van de toedieningsweg. Echter, langs de meeste wegen kan systemische verspreiding plaatsvinden. Shedding kan dan worden verwacht via urine, feces, speeksel en neusslijm, traanvocht en vrijkomend bloed. Aanwezigheid in bloed (en bloedcellen en plasma) wordt in veel gevallen slechts een of enkele dagen aangetoond, tot een week, maar in enkele gevallen is de periode langer, tot vier of zelfs zeven weken. In deze gevallen worden vectorgenomen aangetoond, geen infectieuze partikels.

Een voorbeeld van een biodistributiestudie is Ying et al. (2009). Zij geven informatie over de biodistributie na intraveneuze toediening van een oncolytische Ad-vector, INGN 007, een replicatie-defectieve Ad-vector, AdCMVpA, en Ad5 aan Syrian hamsters ($1,9 \times 10^{12}$ vp/kg). Voor alle drie virussen komt hetzelfde beeld naar voren. Na de toediening werden ze (veruit) het meest gevonden in de lever en milt; een gering aantal vectorgenomen werd gevonden in het bloed (0,3% van de hoeveelheid in de lever) en deze genomen waren vrijwel geklaard op dag 7. Daarnaast werden in alle onderzochte organen kleine hoeveelheden virusgenomen gevonden. In alle gevallen verminderde de hoeveelheid virusgenomen in de loop van de tijd (de metingen beslaan een periode van een jaar). In deze studie is ook gekeken naar de infectiviteit van de virussen in de lever, long en lymfeklieren. De bepaling vond plaats met een tissue culture 50% infectious dose (TCID₅₀) assay. Op het eerste meetpunt (2 dagen na toediening) werden al geen infectieuze replicatie-defectieve vectoren meer aangetoond in de lever, terwijl er op dat moment met PCR nog wel grote hoeveelheden vectorgenomen werden aangetoond. Ook in longweefsel werden geen infectieuze vectorpartikels aangetoond, in de lymfeklieren werden alleen op dag 2 infectieuze partikels aangetoond, maar niet op dag 7.

Ad-vectoren die de lever bereiken worden daar in grote hoeveelheden gebonden, aan hepatocyten en Kuppfercellen. Deze binding belemmert de effectiviteit van Ad-vectoren in gentherapie. De binding verloopt niet via de CAR receptor, een van de belangrijkste receptoren voor de binding van adenovirus aan allerlei celtypen. Bij de binding van Ad-vectoren aan de lever speelt een aantal eiwitfactoren in het serum, met name bloedstollingsfactor F-X, een rol en een aantal motieven in verschillende capsid-eiwitten (voor een review zie Lopez-Gordo et al., 2014). De beschikbaarheid van deze motieven is verschillend in verschillende serotypen van adenovirus. Dat beïnvloedt de mate van binding aan de lever van verschillende serotypen Ad-vectoren. Aan de andere kant beschermt de binding van F-X de gevoeligheid van adenovirus voor immuunglobulinen. Het kan dus zijn dat vermindering van binding aan de lever anderzijds leidt tot verhoogde gevoeligheid voor immunologische inactivering.

In het COGEM advies [CGM/130902-01](#) wordt een discussie gevoerd over de manier waarop kan worden bepaald of een proefdier (muizen en ratten) vrij is van circulerende Ad-vectoren, aan de hand van een bepaling van het aantal vrije vectordeeltjes in het bloed. Deze bepaling wordt ook wel gedaan op plasma, maar Cichon et al. (2003) wijzen erop dat er op die manier vectordeeltjes gemist kunnen worden die gebonden zijn aan erythrocyten. Echter, gezien de gegevens van Ying et al. (2009, zie boven) lijkt het erop dat de aan erythrocyten gebonden vectordeeltjes niet infectieus zijn.

3.3.4 Veiligheid van Ad-vectoren

Een groot aantal klinische studies met Ad-vectoren is beschreven. Een overzichtsartikel van Wold en Toth (2013) concludeert: 'Many clinical trials indicate that replication-defective and replication-competent adenovirus vectors are safe and have therapeutic activity', en 'nearly all clinical trials have indicated that Ad vectors are safe and well tolerated'. In 1999 werd de dood gerapporteerd van een patiënt die behandeld was met een hoge dosis van een Ad-vector. Dit voorval wordt gezien als een incident en is vermoedelijk te wijten aan het feit dat de voorschriften van het protocol niet zijn opgevolgd en dat onvoldoende rekening is gehouden met de situatie van de betreffende patiënt. Een dergelijk incident heeft daarna niet meer plaatsgevonden, ook niet bij gebruik van hoge doses Ad-vectoren. Het incident is uitgebreid bestudeerd; er is een rapport over verschenen van de NIH (National Institutes of Health, 2002). Het rapport geeft een aantal aanbevelingen voor standaardisering van adenovirale vector batches. Er wordt ook gevraagd om een database van clinical trials, en rapportage van waargenomen adverse effects. Een dergelijke database is echter voor zover wij weten niet beschikbaar. Wel bestaat de database Gene Clinical Trials Worldwide¹⁰ (zie ook 2.3.4), die voor Ad-vectoren 101 studies rapporteert.

In paragraaf 3.3.1. werd al gewezen op de toxische werking die Ad-vectoren kunnen hebben bij toediening van grote hoeveelheden bij gentherapie (10^{10} partikels en meer). Bij de eventuele blootstelling van een medewerker zal het gaan om vele orden van grootte lagere hoeveelheden, waarbij deze effecten niet aan de orde zullen zijn.

¹⁰ <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>; het gevonden aantal is in ieder geval te laag, Nederlandse studies ontbreken bijvoorbeeld.

4 Discussie

In dit hoofdstuk wordt de risicoanalyse van replicatie-defectieve AAV- en Ad-vectoren bediscussieerd, en de inschaling voor werkzaamheden onder IG die daaruit volgt. De discussie wordt afzonderlijk gevoerd voor AAV-vectoren (paragraaf 4.2.1-4) en Ad-vectoren (paragraaf 4.3.1-4). Vervolgens wordt de benodigde fysieke inperking voor werkzaamheden onder IG bediscussieerd (paragrafen 4.2.5. en 4.3.5). In de paragrafen 4.2.6 en 4.3.6 worden de conclusies omtrent de inschaling van AAV-vectoren en Ad-vectoren samengevat, mede in het licht van de eerdere COGEM adviezen (paragraaf 1.4).

4.1 Overwegingen voor de inschaling van replicatie-defectieve AAV- en Ad-vectoren

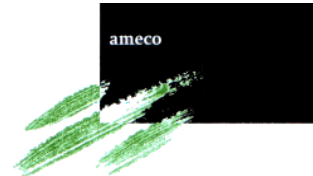
De inschaling van virale vectoren gebeurt in eerste instantie op basis van de criteria van Bijlage 5 van de Regeling (zie bijlage 1). Het leidende criterium voor de hoogte van de inschaling is steeds de (pathogeniteits)klasse van het virus waarvan de vector is afgeleid, of waarvan sequenties in de vector zijn gekloneerd. De pathogeniteitsklasse van alle adenovirussen, onafhankelijk hun herkomst (humaan, of uit dieren), is gesteld op klasse 2. De herkomst van uitgangsvirus, en daarmee ook het serotype en tropisme, heeft daarom geen invloed op de inschaling. Een tweede belangrijk criterium zijn de schadelijke eigenschappen van de genproducten die (kunnen) worden gevormd op basis van de gekloneerde sequenties. Dit rapport behandelt de overwegingen voor de risicoanalyse van AAV- en Ad-vectoren die relevant zijn voor een algemeen advies over de inschaling van deze vectoren. Daarbij wordt ervan uitgegaan dat de gekloneerde sequenties niet coderen voor een schadelijk genproduct, en ook niet zijn afgeleid van een ander virus. Op de eigenschappen van het insert wordt in de overwegingen in dit hoofdstuk dan ook niet ingegaan.

De hoofdstukken 2 en 3, paragrafen 2.3 (AAV-vectoren) en 3.3 (Ad-vectoren), geven een inhoudelijke behandeling van de elementen voor de risicoanalyse. Daar worden ook literatuurreferenties gegeven die de elementen onderbouwen.

4.2 Elementen voor de risicoanalyse van het ingeperkt gebruik van AAV-vectoren

4.2.1 Pathogeniteit en biologische inperking van AAV en AAV-vectoren

AAV wordt algemeen gezien als een apathogeen virus. Een uitgebreid literatuuronderzoek heeft geen steekhoudende rapportage van pathogene effecten van AAV opgeleverd. Er is een groot aantal AAV serotypen en niet serologische getypeerde varianten bekend, met een divers tropisme, maar geen van de serotypen of varianten wordt in verband gebracht met een ziektebeeld bij de mens of bij dieren. Er



zijn van AAV geen specifieke cytopathische effecten bekend. AAV behoort daarmee tot de klasse 1 micro-organismen, conform het criterium dat AAV niet behoort tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant (zie bijlage 2).

De herkomst van een AAV serotype of variant, uit de mens of uit niet-humane primaten, heeft geen consequenties voor de discussie over biologische veiligheid: ze zijn vergelijkbaar infectieus voor de mens, en zijn in gelijke mate te beschouwen als apathogeen.

wt AAV is een kreupel virus doordat het niet efficiënt kan repliceren zonder aanwezigheid van (functies van) een helpervirus. AAV genomen die in de cel komen, worden omgezet in circulaire of lineaire concatameren die in de cel aanwezig blijven, extrachromosomaal of geïntegreerd in het genoom. In humane cellen is er een voorkeursplaats voor integratie van het virusgenoom in een van de chromosomen (chromosoom 19), maar deze integratie vindt alleen plaats als het *rep* gen van AAV aanwezig is en tot expressie komt. Een AAV-vector zonder *rep* zal deze specifieke integratie niet vertonen. Er kan dan met lage frequentie random integratie plaatsvinden van AAV en van AAV-vectoren op andere plaatsen in het genoom. De discussie die is gevoerd over de mogelijkheid dat deze integratie tot tumoren kan leiden, heeft geresulteerd in een consensus dat dit niet het geval is. Het virus kan geactiveerd worden tot productie van viruspartikels door aanwezigheid van een helpervirus, adenovirus of herpesvirus, of door de expressie van de benodigde virusfuncties vanaf een plasmide in of vanaf het chromosoom van een productiecellijn.

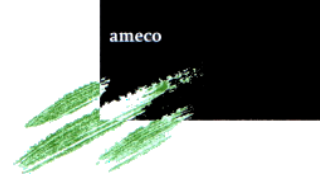
De conclusie is dat AAV gezien kan worden als een micro-organisme van klasse 1. Dat geldt des te meer voor van AAV afgeleide vectoren, die *rep* en *cap* missen, en daardoor ook geen eigenschappen van AAV hebben die berusten op de expressie van deze genen. AAV-vectoren kunnen daarom worden beschouwd als nog verder geattenuëerd dan AAV. Verder voldoen ze aan nog een criterium om tot de klasse 1 micro-organismen te worden gerekend omdat ze het genetisch materiaal missen dat verantwoordelijk is voor de opbouw van het viruspartikel en voor de replicatie van het genoom. Werkzaamheden met dergelijke micro-organismen van klasse 1 kunnen volgens de Regeling worden uitgevoerd onder ML-I en DM-I omstandigheden, zonder aanvullende voorschriften.

Het tropisme van een bepaalde vector, berustend op zijn serotype, speelt geen rol bij de inschaling, gezien het feit dat er aan de toepassing van de vectoren in het algemeen geen risico's kleven,

4.2.2 De mogelijkheid van recombinatie en complementatie tussen de vector en wt AAV

Er is beschreven dat recombinatie tussen AAV-vectoren kan leiden tot de vorming van concatameren, die bestaan uit combinaties van verschillende vectoren. Bij aanwezigheid van een wt AAV in de cel zou een dergelijke recombinatie ook plaats kunnen vinden. Wanneer een dergelijke concatameer wordt gerepliceerd dan ontstaan weer monomeren van de oorspronkelijke vectoren, en, naar mag worden aangenomen, van het eventuele wt virus.

Het ontstaan van een replicatiecompetent AAV uit een vectorpartikel langs een andere – niet-homologe – weg van recombinatie kan door lengterestricties op het virale genoom niet leiden tot de aanwezigheid van de virale genen én een transgen. De observatie dat niet-homologe recombinatie in een



productiecellijn aanleiding kan zijn tot de vorming van replicatie-competent AAV is slechts eenmaal gepubliceerd, en staat op zichzelf. In de gangbare productiesystemen levert dit geen problemen op.

Complementatie van een AAV-vector door de *rep* en *cap* genen van een eventueel naast de vector aanwezig wt AAV zal plaatsvinden als een cel een AAV-vector, wt AAV en een helper virus bevat. Een dergelijke complementatie, maar dan door de aanwezigheid van *rep* en *cap* en virale helper genen op verschillende plasmiden, is immers de basis waarop de productie van AAV-vectoren in productiecellijnen berust. In aanwezigheid van een helpervirus zal dus in zo'n situatie naast de AAV-vector ook wt AAV worden gevormd.

4.2.3 Persistentie en shedding van een AAV-vector na toediening aan een proefdier

De langdurige expressie van het donor DNA in een door een AAV-vector getransduceerde cel/weefsel is overtuigend aangetoond. De vector moet met een hoge *moi* worden toegediend om biologisch significante expressie van de vector te verkrijgen. Door de hoge *moi* zijn in een getransduceerde cel naast 'uitgepakte' vector genomen ook onuitgepakte vectorpartikels aanwezig. Deze vectorpartikels persisten, maar verliezen hun infectiviteit.

De biodistributie van AAV en van AAV-vectoren is afhankelijk van de toedieningsweg (veelal intracraniaal, intravitreaal of subretinaal, of intraveneus) en van het tropisme van het betreffende AAV serotype. Er wordt aangenomen dat het virus zich vanuit verschillende weefsels systemisch kan verspreiden, en terecht kan komen in de cellen waar het tropisme op gericht is. Bij toediening van hoge doses van de vector, bijvoorbeeld bij toediening in het oog (subretinaal), worden echter in het grootste deel van de monsters van verschillende weefsel geen AAV-vectorgenomen aangetoond.

Shedding van AAV-vectoren is aangetoond in verschillende uitgescheiden lichaamsvloeistoffen, zoals feces, urine, traanvocht en speeksel. De gerapporteerde duur van shedding verschilt. Over het algemeen wordt aangegeven dat de duur enkele dagen is tot een week, maar ook langere perioden worden gerapporteerd, tot enkele weken. Shedding wordt over het algemeen aangetoond als aanwezigheid van vectorgenomen in uitgescheiden lichaamsvloeistoffen. Bij de beoordeling van sheddingresultaten is de observatie van belang dat vectorpartikels die later dan drie dagen na toediening worden uitgescheiden al niet meer infectieus zijn. De hoeveelheden vectorpartikels die in het lichaam verspreid of bij shedding worden aangetoond zijn drie of meer orden van grootte geringer dan de hoeveelheden die moeten worden toegediend om voldoende expressie van in de vector gekloneerde genen te verkrijgen.

De aanwezigheid van AAV-vectoren in de bloedbaan wordt in COGEM adviezen gehanteerd als een gegeven op basis waarvan besloten kan worden om dieren onder D-I inperking te kunnen houden (in plaats van onder een DM inperking). Hierbij wordt als criterium een reductiefactor van 10^{-9} gehanteerd. Een dergelijke reductie wordt bereikt na 30 maal de halfwaardetijd van het aantal vectoren in de bloedbaan ($0,5^{30} = 0,9 \times 10^{-9}$). In de literatuur worden voor verschillende serotypen, en ook binnen vectoren van één serotype, zeer verschillende halfwaardetijden gegeven, variërend van minder dan

0,5 tot meer dan 24 uur. Ook wordt niet steeds rekening gehouden met het bi-fasische karakter van de klaring, waardoor halwaardtijden in de loop van de tijd langer worden. Een en ander maakt het lastig om algemene uitspraken te doen over de inactivering van AAV in de bloedbaan.

4.2.4 Gebleken veiligheid van AAV-vectoren

Er zijn geen gegevens bekend waaruit blijkt dat toediening van ook hoge doses van AAV-vectoren zouden leiden tot oncogene of immunologische reacties die gezondheidsschadelijk zijn voor de patiënt. Discussies die worden gevoerd over immunologische reacties betreffen alleen de mogelijke negatieve werking op de effectiviteit van vectoren, wat geen veiligheidsissue is. De AAV-vector Glybera is in de EU toegelaten voor medische toepassingen.

4.3 Elementen voor de risicoanalyse van het ingeperkt gebruik van Ad-vectoren

4.3.1 Pathogeniteit en biologische inperking van adenovirus en Ad-vectoren

Adenovirussen komen voor bij een groot aantal dieren. Er worden vijf genera onderscheiden onderverdeeld in een groot aantal (sero)typen. Alle (sero)typen worden gerekend tot pathogeniteitsklasse 2.

Er zijn van verschillende genera Ad-vectoren afgeleid, die ofwel (conditioneel) replicerend zijn ofwel replicatie-defectief. Op het laatste vectortype wordt in dit rapport ingegaan.

Er worden verschillende 'generaties' van replicatie-defectieve Ad-vectoren onderscheiden. In Ad-vectoren van de eerste generatie zijn de E1A en E1B gebied gedeleteerd. Deze deletie veroorzaakt het replicatie-defectieve karakter van de vectoren. Daarnaast is het E3 gebied vaak gedeleteerd bij deze vectoren. De resterende genen komen laag tot expressie, wat kan leiden tot toxische effecten op de getransduceerde cel. Bij tweede generatie vectoren kunnen de E2A, E2B en E4 gebieden additioneel gedeleteerd zijn, wat op zichzelf ook leidt tot defecte replicatie. Daarnaast leidt dit tot verdere verlaging van de expressie en toxische effecten. Zowel eerste als tweede generatie vectoren zijn door hun replicatie-defectieve karakter voldoende geattenuëerd om als apathogeen te worden gezien. Helper-afhankelijke (HD, 'guttet') Ad-vectoren missen alle adenovirusgenen behalve de ITRs en het packaging signaal, en zijn daarmee apathogeen.

Het replicatie-defectieve karakter van eerste en tweede generatie Ad-vectoren is cruciaal voor het geattenuëerde, apathogene karakter van deze vectoren, een cruciale eigenschap voor de bepaling van de fysische inperking die moet worden gerealiseerd bij werkzaamheden met deze vectoren. Het replicatie-defectieve karakter kan worden gegarandeerd als de mogelijkheden worden uitgesloten dat de op de vector ontbrekende adenovirus functies door complementatie of recombinatie worden teruggebracht in (de cel waarin) de vector (zich bevindt). Op deze mogelijkheden wordt ingegaan in de volgende paragraaf.

4.3.2 De mogelijkheid van recombinatie en complementatie tussen de vector en wt adenovirus

Replicatie-defectieve Ad-vectoren kunnen worden gerepliceerd als de genproducten die voor replicatie nodig zijn worden gecomplementeerd. In productiecellijnen gebeurt dat door de aanwezigheid van de daarvoor benodigde genen op het genoom van de cellijn. Complementatie vindt ook plaats als een getransduceerde cel wordt geïnfecteerd door een replicatiecompetent adenovirus (RCA). Als de vector batch RCA bevat is de kans dat getransduceerde cellen worden geïnfecteerd met RCA vrijwel 100%. Om die reden wordt geëist dat vectorbatches die voor gentherapie zijn bedoeld effectief vrij zijn van RCA. Aanwezigheid van RCA in batches die worden gebruikt voor IG is ook ongewenst omdat er in dat geval ongecontroleerd nieuwe infectieuze vectorpartikels kunnen worden gevormd.

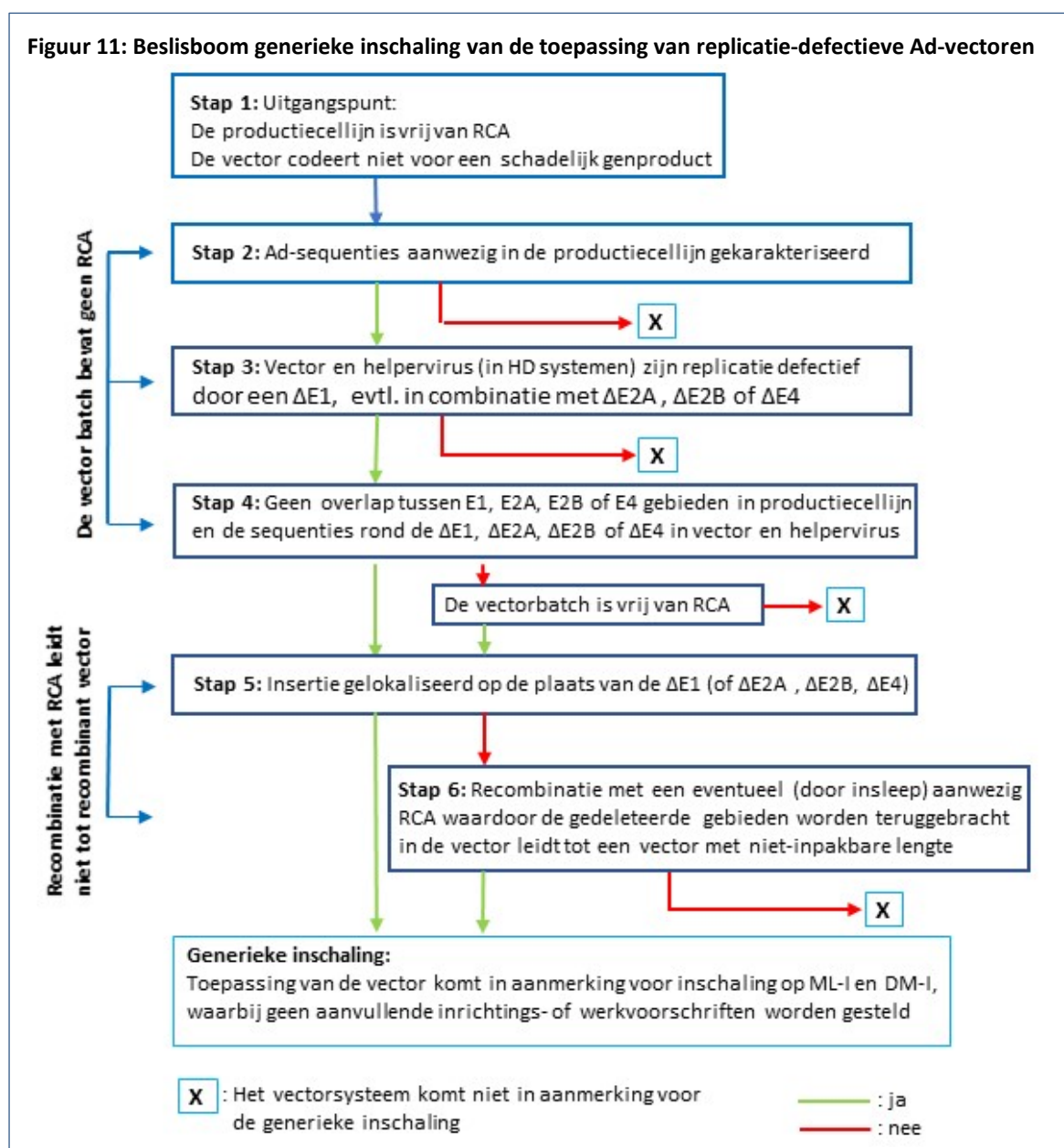
Het is in principe niet uitgesloten dat er uit een replicatie-defectieve vector een RCA wordt gevormd door recombinatiegebeurtenissen waarbij de gedeleteerde replicatiegenen in de vector terug worden gebracht. Dit proces is uitgebreid onderzocht voor productiecellijnen van $\Delta E1$ Ad-vectoren. Daarbij is gebleken dat een kleine homologie in de flankerende sequenties van het E1 gebied voldoende is om tot vorming van RCA te leiden. Alleen wanneer er geen homologie is kan worden gewaarborgd dat er in de productiecellijn geen (ook geen 'aberrant') RCA ontstaat, ook niet bij de productie van grote batches met hoge titers, zoals die worden gebruikt voor gentherapie. Als er wél overlap is, of als overlap niet wordt uitgesloten, dan moet er rekening mee worden gehouden dat er vroeg of laat een RCA zal/kan worden gevormd. De kans op vorming van een RCA is echter betrekkelijk gering bij de kleinschalige productie van vector batches met een omvang die nodig is voor experimenten onder IG. Bij dergelijke batches kan men voldoende zekerheid krijgen over de afwezigheid van RCA door een adequate PCR test, bijvoorbeeld een gevalideerde test met een gevoeligheid van <1 RCA per 5×10^7 vectordeeltjes (zie paragraaf 1.4.2).

In de risicoanalyse wordt ook in beschouwing genomen dat het door recombinatie gevormde RCA een transgen kan dragen; er wordt dan een genetisch gemodificeerde replicatiecompetente vector gevormd. Dit zal niet plaatsvinden in een E1 gedeleteerde vector waarin zich het transgen bevindt in de E1 deletie. Homologe recombinatie waarbij het E1 gebied terug wordt gebracht in de vector leidt dan automatisch tot verlies van de transgenen. Als de transgenen elders zijn aangebracht op een E1 gedeleteerde vector dan zal een recombinatie waarbij het E1 gebied wordt teruggebracht leiden tot een replicatie competente vector die de transgenen draagt. De vraag is dan of een dergelijke vector ook kan worden ingepakt in een capsid, gezien de restricties die bestaan voor de maximale lengte van een vector die nog kan worden ingepakt. In beschouwingen over recombinatiegebeurtenissen die leiden tot replicatiecompetent genetisch gemodificeerd, moeten daarom zorgvuldig afgewogen worden of de vorming van een replicatie-competente vector met transgen wel mogelijk is.

De overwegingen over vectoren met E1 deleties kunnen worden uitgebreid tot vectoren die naast een $\Delta E1$ een $\Delta E2A$, $\Delta E2B$ of $\Delta E4$ dragen. In die gevallen mag er geen overlap zijn tussen de sequenties in de productiecellijn en de flankerende sequenties van tenminste één van deze deleties. Ook voor de plaatsing van de transgenen gelden in dat geval overeenkomstige overwegingen: als deze zijn geplaatst in de $\Delta E2A$, $\Delta E2B$ of $\Delta E4$ dan zullen bij homologe recombinatie van deze deleties met de overeenkomstige sequenties van een wt adenovirus de transgenen verloren gaan.

De criteria of activiteiten onder IG met een batch van een replicatie-defectieve vector kunnen worden ingeschaald op ML-I en DM-I worden samengevat in de volgende beslisboom (figuur 11). Of wordt voldaan aan het criterium in stap 4a: de afwezigheid van overlap tussen de E1, en eventueel E2A, E2B en E4, gebieden tussen de productiecellijn en de vector en, indien van toepassing, het helpvirus, moet worden vastgesteld aan de hand van sequentiegegevens. Deze bepaling kan eenmalig gebeuren; de identiteit van de cellijn moet gewaarborgd worden. Als aan deze voorwaarden niet wordt voldaan moet de afwezigheid van RCA met een adequate test worden aangetoond (stap 4b). Het is nog een punt van discussie of de generieke inschaling niet alleen geldt voor het gebruik van geproduceerde vector batches, maar ook zou kunnen worden toegepast op de productie van batches Ad-vectoren.

Figuur 11: Beslisboom generieke inschaling van de toepassing van replicatie-defectieve Ad-vectoren



4.3.3 Persistentie en shedding van een Ad-vector na toediening aan een proefdier

Gepubliceerde biodistributiestudies zijn lastig vergelijkbaar, onder meer doordat er geen gestandaardiseerde methode is waarop de studies worden uitgevoerd. Wel kan de conclusie worden getrokken dat de biodistributie van Ad-vectoren na toediening aan een proefdier afhankelijk is van de plaats en wijze van toediening van de vector. Hierbij speelt ook het serotype en het tropisme van de vector een rol. Maar uiteindelijk zal de toediening in alle gevallen leiden tot een mate van systemische verspreiding.

Ad-vectoren die intraveneus worden toegediend zullen voor een groot deel snel worden opgenomen in de lever, door hepatocyten en Kuppfercellen. Deze opname is afhankelijk van de interactie tussen een groot aantal eiwitfactoren, zoals de stollingsfactoren F-IX en F-X, en domeinen in de capside-eiwitten van adenovirus. Deze domeinen zijn in verschillende mate beschikbaar in verschillende adenovirus serotypen. Inactivering van Ad-vectoren door opname in de lever is, naast inactivering door antilichamen, een belangrijke factor voor de effectiviteit van een Ad-vector in gentherapie. Dit is een factor bij de keuze van een bepaald serotype bij de ontwikkeling van een gentherapie vector, maar het heeft geen invloed op de veiligheidsoverwegingen voor de vectoren.

Opname in andere weefsels, met name bloed en de milt, gebeurt, maar in mindere mate. Andere toedieningswijzen bij proefdieren, bijvoorbeeld intratumoraal, komen veelvuldig voor, maar ook daar kan worden verwacht dat de vector andere weefsels bereikt als deze de bloedbaan kan bereiken.

Gegevens over klaring van de vector laten zien dat de hoeveelheid vectorgenomen drastisch daalt in de eerste dagen na toediening. Veel van deze vectorgenomen zullen zich bevinden in vectordeeltjes die gebonden zijn aan cellen. Bij bepaling van circulerende vectoren in bloed worden bijvoorbeeld verschillen gevonden afhankelijk van of de bepaling op bloed of serum wordt gedaan; een (groot) deel van de vectorpartikels kan gebonden zijn aan bloedcellen.

Het is de vraag in hoeverre de aangetoonde vectorgenomen, in bloed en in andere weefsels, duiden op de aanwezigheid van infectieuze vectordeeltjes. In Syrian hamsters is bijvoorbeeld aangetoond dat het aantal infectieuze vectordeeltjes van een replicatie-defectieve Ad5-vector in lever, longen en lymfeklieren binnen twee dagen tot een week na toediening gereduceerd is tot niet-detecteerbaar.

4.3.4 Gebleken veiligheid van Ad-vectoren

In de literatuur wordt algemeen gesteld dat uit het grote aantal klinische studies dat is gedaan met Ad-vectoren blijkt dat de vectoren effectief zijn, en goed worden verdragen, ook in de hoge doses (10^{10} of meer) die bij gentherapie worden toegediend. De voor Ad-vectoren, met name eerste generatie vectoren, beschreven toxische effecten spelen in de praktijk dus geen rol van betekenis. In 1999 vond een incident plaats waarbij een patiënt is overleden ten gevolge van immunologische reacties op de toegediende hoge dosis ($3,8 \times 10^{13}$) vectordeeltjes. Dit incident staat op zichzelf en is te wijten aan het niet goed opvolgen van de voorschriften van het protocol van de studie.

De blootstelling van medewerkers die onder IG verwacht kan worden is vele orden van grootte lager dan de doses die in klinische studies worden gebruikt. In het onwaarschijnlijke geval dat deze bloot-

stelling leidt tot transductie van cellen, dan is het waarschijnlijk dat deze cellen door het immuunsysteem worden opgeruimd. Er mag daarom van uit worden gegaan dat Ad-vectoren onder deze omstandigheden onschadelijk zijn.

4.4 Overwegingen over de benodigde fysische inperking

De volgende overwegingen gelden voor de benodigde fysische inperking voor handelingen met cellijnen, proefdieren en cellen en weefsels afkomstig van proefdieren en de mens die zijn geïnfecteerd met een replicatie-defectieve AAV- of Ad-vectoren waarin geen DNA sequenties zijn gekloneerd die coderen voor schadelijke genproducten.

AAV is zeer stabiel *in vitro*. Bij 4°C treedt er een verlies aan infectieus virus op van 20% in 7 weken. Op roestvrijstalen oppervlakken (zoals in een veiligheidskabinet) worden infectieus virus en infectieuze vectorpartikels teruggevonden na ten minste 6 dagen bij kamertemperatuur (Howard en Hedley, 2017).

Ook adenovirus en Ad-vectoren zijn zeer stabiel onder milieumomstandigheden. De samenstelling van het capside speelt wel een rol bij de stabiliteit van Ad-vectoren. Afwezigheid van pIX leidt bijvoorbeeld tot een minder robuust vectorpartikel.

Routinematige desinfectie van AAV, adenovirus en van de afgeleide vectoren is geen probleem. AAV kan worden geïnactiveerd met 0,5% hypochloriet en met zure of basische detergentia. Adenovirus kan worden geïnactiveerd met basische detergentia (SDS-NaOH).

Onder ML-I en DM-I (Bijlage 9 van de Regeling, zie bijlage 3) wordt vereist dat ontstaan en verspreiding van aerosolen wordt *vermeden*; gebruik van een veiligheidskabinet is uit het oogpunt van biologische veiligheid niet verplicht. Blijkens deze voorschriften wordt ervan uitgegaan dat er een zekere verspreiding van micro-organismen plaatsvindt, maar dat aan deze geringe mate van verspreiding geen risico's verbonden zijn, aangezien er onder deze niveaus van fysische inperking wordt gewerkt met apathogene organismen, waarvan geen schadelijke effecten zijn te verwachten omdat zij geen transgenen die zullen leiden tot schadelijke effecten.

De natuurlijke verspreidingsroute van AAV is onbekend. Er wordt aangenomen dat het virus zich verspreidt via blootstelling van slijmvliezen aan aerosolen en druppeltjes, en langs orale weg.

Verspreiding van adenovirus gebeurt door aërogene overdracht, door directe infectie van de conjunctiva, door oro-fecale verspreiding, of door blootstelling aan geïnfecteerde weefsels of bloed en via besmette oppervlakken (Lynch et al., 2011). Onder laboratoriumomstandigheden zouden inperkingsmaatregelen zich moeten richten, naast de beperking van direct contact, op het beperken van aërogene verspreiding. De omstandigheden van ML-I en DM-I zijn hierop gericht.

Bij toediening van een vector aan cellijnen of weefsels en bij werkzaamheden met cellijnen die geïnfecteerd zijn met een vector worden de vorming en verspreiding van aerosolen routinematig vermeden door de toepassing van veilige microbiologische technieken. Datzelfde geldt voor toediening aan proefdieren: deze toediening geschiedt via gesloten systemen. De zeer geringe volumina die daarbij vrij kunnen komen zullen niet zozeer als aerosol vrijkomen, maar door lekkage.

Voor AAV-vectoren geldt dat, gezien de zeer hoge *moi* die nodig is voor een effectieve transductie, het onwaarschijnlijk is dat de vector vrijkomt in hoeveelheden die hoog genoeg zijn om een infectie van

een persoon of een proefdier te bewerkstelligen die leidt tot transductie. Maar ook de blootstelling aan Ad-vectoren zal aanzienlijk geringer zijn, en niet de directe infectieweg volgen, die bij gerichte toepassingen leidt tot effectieve transductie.

Monsters die worden genomen van weefsels van proefdieren die met een vector zijn behandeld zullen, afhankelijk van de biodistributie van de vector, vectorgenomen (kunnen) bevatten. Bij AAV-vectoren kan ervan uit worden gegaan dat het, vanaf enkele dagen na de toediening, daarbij niet langer gaat om infectieuze vectordeeltjes. Voor een Ad5-vector is aangetoond op dag 2 tot na een week na de toediening al geen infectieuze deeltjes meer aantoonbaar zijn in verschillende weefsels.

Bij handelingen buiten fysieke inperking met cellen en weefsels die met de vector geïnfecteerd (kunnen) zijn, moet verspreiding naar de omgeving worden tegengegaan. Dat kan gebeuren door de aanwezigheid van vrije infectieuze vectordeeltjes zoveel mogelijk te beperken, bijvoorbeeld door wassen of spoelen van de monsters. Toediening van de vector aan cellen of weefsels buiten fysieke inperking levert in principe niet meer risico op dan toediening binnen inperking, als maatregelen die aëroge verspreiding tegengaan en desinfectiemaatregelen worden genomen, vergelijkbaar met de maatregelen onder ML-I.

De huisvesting van geïnfecteerde proefdieren kan op DM-I plaatsvinden. De DM-I voorschriften bepalen dat kruiscontaminatie van dier tot dier wordt voorkomen (Regeling, paragraaf 9.1.6.1.2 f). Voor AAV-vectoren geldt dat kruiscontaminatie zou kunnen plaatsvinden door infectie gedurende de eerste dagen na toediening, wanneer er een geringe mate shedding van infectieuze vectordeeltjes kan optreden. In een experiment waarbij gebruik gemaakt werd van 'sentinel' dieren (zie paragraaf 2.3.3) is echter geen kruiscontaminatie waargenomen. Het is onwaarschijnlijk dat de hoeveelheid vectoren die door shedding vrijkomt voldoende is om een transductie bij een ander proefdier te bewerkstelligen. Voor Ad-vectoren zijn geen gegevens over sentinel dieren gevonden. Voor Ad-vectoren kan op grond van de beschikbare gegevens worden verwacht dat er *in vivo* slechts gedurende enkele dagen na toediening infectieuze vectordeeltjes aanwezig zijn; de kans op kruiscontaminatie is daarom klein.

Wanneer de vector uit proefdieren is geklaard, is de inschaling D-I van toepassing. Voor de klaring wordt nu als criterium gebruikt dat geen vectorgenomen meer aantoonbaar zijn in bloed. Ook hier geldt dat de aanwezigheid van vectorgenomen niet gelijkgesteld mag worden met aanwezigheid van infectieuze vectordeeltjes, die (veel) geringer zal zijn. Zowel voor AAV-vectoren als voor Ad-vectoren kan op grond van de beschikbare gegevens geconcludeerd worden dat er *in vivo* slechts gedurende enkele dagen na toediening infectieuze vectordeeltjes aanwezig zijn; de kans dat deze vrijkomen is zeer laag of nihil.

4.5 Conclusies ten aanzien van de inschaling

4.5.1 Conclusies ten aanzien van de inschaling van AAV-vectoren

AAV kan, in tegenstelling tot de huidige inschalingspraktijk, worden gezien als apathogeen. Voor AAV-vectoren geldt dat zij met zekerheid apathogeen zijn. Het replicatie-defectieve karakter van de vectoren kan onder IG worden gewaarborgd door ervoor te zorgen dat cellijnen waarin de vectoren

worden toegepast vrij worden gehouden van wt AAV of helpervirussen, en door te zorgen dat ook proefdieren vrij zijn van wt AAV en van helpervirussen. Onder deze voorwaarden zijn aan het ingeperkt gebruik van AAV-vectoren die geen transgenen dragen die coderen voor een schadelijk genproduct, geen risico's verbonden. Een standaard inschaling op ML-I en DM-I ligt daarom voor de hand. Bij de overwegingen over de veiligheid van het gebruik van AAV-vectoren zijn geen overwegingen gemaakt die betrekking hebben op het serotype of tropisme van de vectoren. De inschaling geldt daarom voor alle serotypen en ook voor vectoren waarin door aanpassingen aan het capside tropismeveranderingen zijn geïntroduceerd. De observatie dat bij met een AAV2-vector behandelde muizen geen kruiscontaminatie optreedt naar 'sentinel' muizen biedt verdere ondersteuning voor een DM-I inschaling, waarbij de dieren zijn gehuisvest in kooien.

Bijlage 9 van de Regeling (zie bijlage 3) bepaalt dat bij werkzaamheden onder ML-I en DM-I de vorming en verspreiding van aërosolen moet worden vermeden.

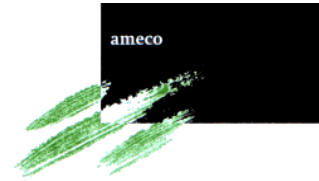
Door de COGEM is geadviseerd dat toediening van AAV-vectoren aan proefdieren kan plaatsvinden buiten een veiligheidskabinet, onder DM-II. Daarbij is overwogen dat het, gezien de aard van AAV-vectoren, onwaarschijnlijk is dat er sprake zou zijn van een reëel risico voor mens en milieu. In een ander geval werden werkzaamheden waarbij aanwezigheid van AAV-vectoren niet is uitgesloten, ingeschaald op ML-I. Daarbij werden aanvullende voorschriften gegeven: het dragen van een bril en een mond- en neuskapje en het gebruik van handschoenen. Deze voorschriften zullen uit voorzorg genomen zijn; gezien de bevindingen in dit rapport zou een dergelijke voorzorg niet langer noodzakelijk zijn.

Onder DM-I omstandigheden worden proefdieren gehouden in kooien; kruiscontaminatie moet worden voorkomen. Er wordt algemeen aangenomen dat shedding van AAV-vectorgenomen optreedt gedurende enkele dagen na toediening tot een week, dan wel, in gevallen waarin shedding gedurende langere perioden werd aangetoond, dat het gaat om hoeveelheden waarvan kan worden aangenomen dat zij niet zullen leiden tot effectieve transductie. Het is daarom onwaarschijnlijk dat deze shedding zal leiden tot kruiscontaminatie, en daarmee wordt voldaan aan het betreffende DM-I voorschrift.

Plaatsing van proefdieren in D-I kan gebeuren op het moment dat aangenomen kan worden dat de dieren effectief geen infectieuze AAV-vectoren meer zullen uitscheiden.

In de COGEM adviezen wordt de klaring van AAV-partikels uit de bloedbaan als criterium genomen voor plaatsing in D-I. Het is lastig om op basis van literatuurgegevens een schatting te maken van het moment waarop de klaring gerealiseerd zal zijn. De gepubliceerde halfwaardetijden voor de reductie van AAV-partikels in de bloedbaan lopen zeer uiteen, zowel voor verschillende serotypen als voor verschillende vectoren binnen één serotype. Hierbij moet worden opgemerkt dat klaring in de meeste gevallen wordt aangetoond aan de hand van nog resterende vectorgenomen. Dit is een 'worst case' inschatting, aangezien het veelal niet zal gaan om vectorgenomen in infectieuze partikels. Er wordt aangenomen dat de shedding van infectieuze AAV-vectorpartikels slechts gedurende enkele dagen plaatsvindt.

In een aantal gevallen bestaat de wens om werkzaamheden waarbij speciale apparatuur wordt gebruikt, uit te voeren in een ruimte buiten fysieke inperking waar deze apparatuur is opgesteld voor algemeen gebruik. Bij de werkzaamheden gaat het niet om cultivatie van cellen en weefsels of om het langdurig houden van proefdieren. Er worden veiligheidsvoorschriften gehanteerd die equivalent zijn



met de veiligheidsvoorschriften van ML-I: vorming van aërosolen wordt vermeden en de werkplek en gebruikte apparatuur worden na de werkzaamheden gedesinfecteerd. Daarnaast kan de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes worden gelimiteerd door gebruikte cellen en weefsels voorafgaand te wassen. De wens is redelijk indien, zoals het geval is bij AAV-vectoren die niet coderen voor een schadelijk gen-product, het risico van de werkzaamheden dusdanig verwaarloosbaar is dat er geen winst zal worden behaald met het verder bestrijden van het risico door de werkzaamheden onder ML-I uit te voeren.

4.5.2 Conclusie ten aanzien van de inschaling van Ad-vectoren

Replicatie-defectieve Ad-vectoren zijn afgeleid van een klasse 2 pathogeen; werkzaamheden met deze vectoren zijn tot op heden (met één uitzondering) ingeschaald op ML-II. De vectoren kunnen echter worden gezien als geattenuëerd, vanwege het replicatie defect. Zij zijn daarmee onschadelijk (apathogeen). Het replicatie-defectieve karakter van de vectoren kan onder IG worden gewaarborgd door ervoor te zorgen dat voor de productie van de vector batch een combinatie van vector en productieceldlijn wordt gebruikt waarbij ervoor wordt gezorgd dat er geen overlap is tussen de E1 (en E2A, E2B of E4) adenovirussequenties in de productieceldlijn en de sequenties die de deletie flankeren in de vectoren, zodat dat er geen RCA wordt gevormd door homologe recombinatie. Als deze waarborgen niet kunnen worden gegeven moeten individuele batches worden gecontroleerd op afwezigheid van RCA. Cellijnen waarin de vectoren worden toegepast moeten vrij worden gehouden van RCA; de identiteit van deze cellijnen moet worden gewaarborgd.

Onder DM-I omstandigheden worden proefdieren gehouden in kooien; kruiscontaminatie moet worden voorkomen. Er is consensus dat shedding van Ad-vectorgenomen optreedt gedurende enkele dagen tot enkele weken na toediening. De uitscheiding van infectieuze vectordeeltjes is geringer en duurt korter, in de orde van dagen. Het is daarom onwaarschijnlijk dat deze shedding zal leiden tot kruiscontaminatie.

Als voldaan is aan de voorwaarden over beperking van RCA, is het risico dat kleeft aan handelingen met replicatie defectieve Ad-vectoren verwaarloosbaar klein en ligt voor IG een standaard inschaling op ML-I en DM-I, zonder aanvullende voorschriften, voor de hand.

Plaatsing van proefdieren in D-I kan gebeuren op het moment dat (eventueel op basis van eerder verkregen gegevens) aangenomen kan worden dat de dieren geen infectieuze Ad-vectoren meer dragen. Klaring van de vector uit bloed kan hiervoor als criterium worden genomen, maar hier zou ook kunnen worden gekozen voor het moment waarop verwacht kan worden dat er geen infectieuze vectorpartikels meer worden uitgescheiden.

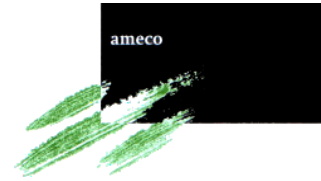
In een aantal gevallen bestaat de wens om werkzaamheden waarbij speciale apparatuur wordt gebruikt, uit te voeren in een ruimte buiten fysieke inperking waar deze apparatuur is opgesteld voor algemeen gebruik. Bij de werkzaamheden gaat het niet om kweken van cellen en weefsels of om het langdurig houden van proefdieren. Er worden veiligheidsvoorschriften gehanteerd die equivalent zijn met de veiligheidsvoorschriften van ML-I: vorming van aërosolen wordt vermeden en de werkplek en gebruikte apparatuur worden na de werkzaamheden gedesinfecteerd. Daarnaast kan de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes worden gelimiteerd door gebruikte cellen en weefsels vooraf te wassen. Proefdieren die onder D-I gehouden kunnen worden zouden ook zonder veiligheidsrisico kunnen worden gebruikt in proefopstellingen buiten een fysiek ingeperkte ruimte indien de ruimte, de gebruikte apparatuur en de gevolgde werkprotocollen voldoen aan de D-I eisen.

De wens is redelijk indien, zoals het geval is bij replicatie defectieve Ad-vectoren die niet coderen voor een schadelijk genproduct, het risico van de werkzaamheden dusdanig verwaarloosbaar is dat er geen winst zal worden behaald met het verder bestrijden van het risico door de werkzaamheden onder ML-I uit te voeren.

4.5.3 Opmerkingen bij de resultaten van de survey (bijlage 4)

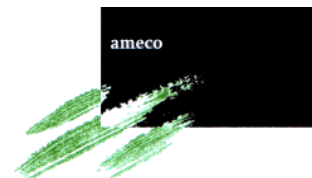
Beide respondenten geven aan dat de risico's van handelingen met AAV-vectoren die geen insert dragen dat codeert voor een schadelijk genproduct, verwaarloosbaar klein zijn. Proefdieren die zijn geïnjecteerd met AAV-vectoren worden gedurende enkele dagen gehouden onder BSL2, maar kunnen daarna gehouden worden op een lager inperkingsniveau. De respondenten geven aan dat in de praktijk alle experimenten worden uitgevoerd onder BSL2, om verwarring te voorkomen als er ook experimenten worden uitgevoerd met AAV-vectoren die wel een insert dragen dat codeert voor een schadelijk genproduct. Dit laat onverlet dat voor handelingen met AAV-vectoren waaraan een verwaarloosbaar risico is verbonden, de correcte lagere inschaling zou moeten worden afgegeven.

Handelingen met replicatie defectieve Ad-vectoren worden door alle respondenten in principe uitgevoerd onder BSL2 inperking. In het V.K. wordt echter een gedifferentieerde aanpak gevolgd, gebaseerd op een case-by-case risicoanalyse die kan uitkomen op BSL1, als de vector geen insert draagt dat codeert voor een schadelijk genproduct. Het plaatselijke Biosafety Committee beslist over de inschaling en beslist ook of de laboratoriumruimten waarin de werkzaamheden worden uitgevoerd voldoen aan de eisen. In de V.S. spelen de biosafety officer en het lokale Biosafety Committee een vergelijkbare rol.



Referenties

- Alba, R., Bosch, A., Chillon, M. (2005) Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Therapy* 12, S18–S27. DOI: 10.1038/sj.gt.3302612
- Berns, K.I. (1990) Parvovirus Replication. *Microbiological Reviews*, 54, 316–329.
- Bortolussi, G., Zentilin, L., Vaníkova, J., Bockor, L., Bellarosa, C., Mancarella, A., Vianello, E., Tiribelli, C., Giacca, M., Vitek, L., Muro, A.F. (2014) Life-Long Correction of Hyperbilirubinemia with a Neonatal Liver-Specific AAV-Mediated Gene Transfer in a Lethal Mouse Model of Crigler–Najjar Syndrome. *Human Gene Therapy*, 25, 844–855. DOI: 10.1089/hum.2013.233
- Bett, A.J., Prevec, L., Graham, F.L. (1993) Packaging Capacity and Stability of Human Adenovirus Type 5 Vectors. *J. Virology*, 67, 5911–5921.
- Blacklow, N.R., Hoggan, M.D., Sereno, M.S., Brandt, C.D., Kim, H.W., Parrott, R.H., Chanock, R.M. (1971) A Seroepidemiologic Study of Adenovirus-Associated Virus Infection in infants and children. *American Journal of Epidemiology* 94, 359 – 366.
- Brandon, E.F., Hermesen, H.P., Van Eijkeren, J.C., Tiesjema, B. (2010) Effect of Administration Route on the Biodistribution and Shedding of Replication-Deficient AAV2: A Qualitative Modelling Approach. *Curr Gene Ther.* 10, 91–106.
- Chen, C., Akerstrom, V., Baus, J., Lan, M.S., Breslin, M.B. (2013) Comparative analysis of the transduction efficiency of five adeno associated virus serotypes and VSV-G pseudotype lentiviral vector in lung cancer cells. *Virol. J.* 10: 86. DOI: 10.1186/1743-422X-10-86
- Cichon, G., Boeckh-Herwig, S., Kuemin, D., Hoffmann, C., Schmidt, H.H., Wehnes, E., Haensch, W., Schneider, U., Eckhardt, U., Burger, R., Pring-Akerblom, P. (2003) Titer determination of Ad5 in blood: a cautionary note. *Gene Therapy* 10, 1012–1017. DOI: 10.1038/sj.gt.3301961
- Cogné, B., Snyder, R., Lindenbaum, P., Dupont, J-B., Redon, R., Moullier, P., Leger, A. (2014) NGS library preparation may generate artifactual integration sites of AAV vectors. *Nature Medicine* 20, 577 – 8. DOI: 10.1038/mtna.2015.32
- Cots, D., Bosch, A., Chillón, M. (2013) Helper Dependent Adenovirus Vectors: Progress and Future Prospects. *Current Gene Therapy*, 13, 370–381.
- Danthinne, X., Imperiale, M.J. (2000) Production of first generation adenovirus vectors: a review *Gene Therapy* 7, 1707–1714.
- Davison, A.J., Benkő, M., Harrach, B. (2003) Genetic content and evolution of adenoviruses. *Journal of General Virology* 84, 2895–2908. DOI: 10.1099/vir.0.19497-0
- Dismuke, D.J., Tenenbaum, L., Samulski, J.R. (2013) Biosafety of Recombinant Adeno-associated Virus Vectors. *Current Gene Therapy* 13, 434–452.
- Dong, B, Moore, A.R., Dai, J., Roberts, S., Chu, K., Kapranov, P., Moss, B., Xiao, W. (2013) A concept of eliminating nonhomologous recombination for scalable and safe AAV vector generation for human gene therapy. *Nucleic Acids Research* 41, 6609–6617. DOI: 10.1093/nar/gkt404
- Ertl, H.C., High, K.A. (2017) The impact of AAV capsid-specific T cell responses on design and outcome of clinical gene transfer trials with recombinant AAV vectors: an evolving controversy. *Human Gene therapy* 28, 328–337. DOI: 10.1089/hum.2016.172



EMA (2012) Assessment Report Glybera. [EMA/882900/2011](https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/glybera/glybera.htm)

Fallaux, F.J., Kranenburg, O., Cramer, S.J., Houweling, A., Van Ormondt, H., Hoebe, R.C., Van der Eb, A.J. (1996) Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 7, 215-222. DOI: 10.1089/hum.1996.7.2-215

Fallaux, F.J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D.J., Hehir, K.M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S.J., van Ormondt, H., van der Eb, A.J., Valerio, D., Hoebe, R.C. (1998) New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* 9, 1909-1917. DOI: 10.1089/hum.1998.9.13-1909

Farson, D., Tao, L., Ko, D., Li, Q., Brignetti, D., Segawa, K., Mittelstaedt, D., Harding, T., Yu, D.C., Li, Y. (2006) Development of novel E1-complementary cells for adenoviral production free of replication-competent adenovirus. *Mol. Ther.* 14, 305-311. DOI: 10.1016/j.ymthe.2006.02.020

Favre, D., Provost, N., Blouin, V., Blanche, G., Chérel, Y., Salvetti, A., Moullier, P. (2001) Immediate and Long-Term Safety of Recombinant Adeno-associated Virus Injection into the Nonhuman Primate Muscle. *Molecular Therapy* 4, 559-566. DOI: 10.1006/mthe.2001.0494

Felberbaum, R.S. (2015) The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnol J.* 10, 702-14. DOI: 10.1002/biot.201400438

Gao, G.P., Engdahl, R.K., Wilson, J.M. (2000) A cell line for high-yield production of E1-deleted adenovirus vectors without the emergence of replication-competent virus. *Hum. Gene Ther.* 11, 213-219.

Gao, G.P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., Wilson, J.M. (2002) Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 11854–11859. DOI: 10.1073/pnas.182412299

Gao, G., Vandenberghe, L.H., Alvira, M.R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X., Wilson, J.M., 2004. Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J. Virol.* 78, 6381–6388. DOI: 10.1128/JVI.78.12.6381–6388.2004

Garolla, A., Pizzol, D., Bertoldo, A., Menegazzo, M., Barzon, L., Foresta, C. (2013) Sperm viral infection and male infertility: focus on HBV, HCV, HIV, HPV, HSV, HCMV, and AAV. *Journal of Reproductive Immunology*, 100, 20-29. DOI: 10.1016/j.jri.2013.03.004

Gestel, M.A. van, Boender, A.E., De Vrind, V.A.J., Garner, K.M., Luijendijk, M.C.M., Adan, R.A.H. (2014). Recombinant adeno-associated virus: efficient transduction of the rat VMH and clearance from the blood. *Plos One* 9:e97639. DOI: 10.1371/journal.pone.0097639

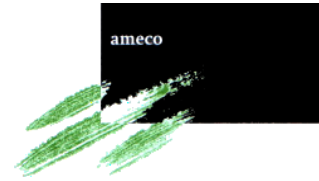
Ghebremedhin, B. (2014) Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol* 4, 26–33. DOI: 10.1556/EuJMI.4.2014.1.2

Glasgow, J.N., Everts, M., Curiel, D.T. (2006) Transductional targeting of adenovirus vectors for gene therapy. *Cancer Gene Therapy* 13, 830–844. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700928

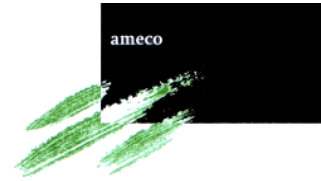
Gonçalves, M.A.F.G. (2005) Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology Journal* 2005, 2, 43-59. DOI: 10.1186/1743-422X-2-43

Gorziglia, M.I., Lapcevich, C., Roy, S., Kang, Q., Kadan, M. Wu, V., Pechan, P., Kaleko, M. (1999) Generation of an Adenovirus Vector Lacking E1, E2a, E3, and All of E4 except Open Reading Frame 3. *Journal of Virology*, 73, 6048–6055

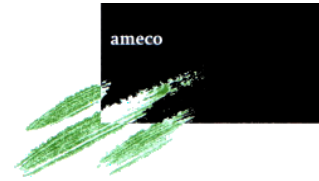
Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-74. DOI: 10.1099/0022-1317-36-1-59



- Greig, J.A., Nordin, J.M.L., Bote, E., Makaron, L., Garnett, M.E., Kattenhorn, L.M., Bell, P., Goode, T., Wilson, J.M. (2016) Impact of intravenous infusion time on AAV8 vector pharmacokinetics, safety, and liver transduction in cynomolgus macaques. *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development* 3, 16079. DOI: 10.1038/mtm.2016.79
- Grieger, J.C., Choi, V.W., Samulski, R.J. (2006) Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nature Protocols*, 1, 1412 – 1428. DOI: 10.1038/nprot.2006.207
- Grieger, J.C., Soltys, S.M., Samulski, R.J. (2016) Production of Recombinant Adeno-associated Virus Vectors Using Suspension HEK293 Cells and Continuous Harvest of Vector From the Culture Media for GMP FIX and FLT1 Clinical Vector. *Molecular Therapy* 24, 287–297. DOI: 10.1038/mt.2015.187
- Grimm, D., Kern, A., Rittner, K., Kleinschmidt, J.A. (1998) Novel Tools for Production and Purification of Recombinant Adenoassociated Virus Vectors. *Human Gene Therapy*, 9, 2745-2760. DOI: 10.1089/hum.1998.9.18-2745.
- Grimm, D., Kay, M.A., Kleinschmidt, J.A. (2003) Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Molecular therapy*, 7, 839–850. DOI: 10.1016/S1525-0016(03)00095-9
- Grimm, D. (2015) *Encyclopedia of cancer*. Ed. M. Schwab, Springer Berlin Heidelberg DOI: 10.1007/978-3-642-27841-9_8-2
- Grimm, D., Zolotukhin, S. (2015) *E Pluribus Unum*: 50 Years of Research, Millions of Viruses, and One Goal—Tailored Acceleration of AAV Evolution. *Molecular Therapy*, 1819–1831. DOI: 10.1038/mt.2015.173
- Hastie, E., Samulski, R.J. (2015) Adeno-Associated Virus at 50: A Golden Anniversary of Discovery, Research, and Gene Therapy Success—A Personal Perspective. *Human Gene Therapy* 26, 257–265. DOI: 10.1089/hum.2015.025
- Hoeben, R.C., Uil, T.G. (2013) Adenovirus DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a013003. DOI: 10.1101/cshperspect.a013003
- Howard, D.B., Harvey, B.K. (2017) Assaying the Stability and Inactivation of AAV Serotype 1 Vectors. *Human Gene Therapy Methods*. 28, 39-48. DOI: 10.1089/hgtb.2016.180.
- Hoyng, S.A., De Winter, F., Gnani, S., Van Egmond, L., Attwell, C.L., Tannemaat, M.R., Verhaagen, J., Malessy, M.J.A. (2015) Gene delivery to rat and human Schwann cells and nerve segments: a comparison of AAV 1–9 and lentiviral vectors. *Gene Therapy*, 22, 767-780. DOI: 10.1038/gt.2015.47
- Howe, J.A., Pelka, P., Antelman, D., Wilson, C., Cornell, D., Hancock, W., Ramachandra, M., Avanzini, J., Horn, M., Wills, K., Sutjipto, S., Ralston, R. (2006) Matching complementing functions of transformed cells with stable expression of selected viral genes for production of E1-deleted adenovirus vectors. *Virology* 345, 220-230. DOI: 10.1016/j.virol.2005.09.029
- Kaepfel, C., Beattie, S.G., Fronza, R., Van Logtenstein, R., Salmon, F., Schmidt, S., Wolf, S., Nowrouzi, A., Glimm, H., Von Kalle, C., Petry, H., Gaudet, D., Schmidt, M. (2013) A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nature Medicine*, 19, 889-892. DOI: 10.1038/nm.3230
- Kotchet, N.M., Adachi, K., Zahid, M., Inagaki, K., Charan, R., Parker, R.S., Nakai, H., (2011) A Potential Role of Distinctly Delayed Blood Clearance of Recombinant Adeno-associated Virus Serotype 9 in Robust Cardiac Transduction. *Molecular Therapy* 19, 1079–1089. DOI: 10.1038/mt.2011.3
- Kovesdi, I., Hedley, S.J. (2010) Adenoviral Producer Cells. *Viruses* 2, 1681-1703. DOI: 10.3390/v2081681
- Kurachi, S., Koizumi, N., Sakurai, F., Kawabata, K., Sakurai, H., Nakagawa, S., Hayakawa, T., Mizuguchi, H. (2007) Characterization of capsid-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in the fiber knob, protein IX, or hexon. *Gene Therapy* 14, 266–274. DOI: 10.1038/sj.gt.3302859



- Le Guiner, C., Moullier, P., Arruda, V.R. (2011) Biodistribution and shedding of AAV vectors. *Methods Mol Biol.* 807, 339-59. DOI: 10.1007/978-1-61779-370-7_15
- Löw, K., Aebischer, P., Schneider, B.L. (2013) Direct and Retrograde Transduction of Nigral Neurons with AAV6, 8, and 9 and Intraneuronal Persistence of Viral Particles. *Human Gene Therapy* 24, 613–629. DOI: 10.1089/hum.2012.174
- Lopez-Gordo, E., Denby, L., Nicklin, S.A., Baker, A.H. (2014) The importance of coagulation factors binding to adenovirus: historical perspectives and implications for gene delivery, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 11, 1795-1813. DOI: 10.1517/17425247.2014.938637
- Lynch, J.P., Fishbein, M., Echavarria, M. (2011) Adenovirus Semin *Respir Crit Care Med.* 32, 494-511. DOI: 10.1055/s-0031-1283287
- Matsushita, T., Elliger, S., Elliger, C., Podsakoff, G., Villarreal, L., Kurtzman, G.J., Iwaki, Y., Colosi, P. (1998) Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Therapy* 5, 938–945.
- Mattar, C.N.Z., Gil-Farina, I., Rosales, C., Johana, N., Yi Wan Tan, Y., McIntosh, J., Kaepfel, C., Waddington, S.N., Biswas, A., Choolani, M., Schmidt, M. Nathwani, A.C., Chan, J.K.Y. (2017) In Utero Transfer of Adeno-Associated Viral Vectors Produces Long-Term Factor IX Levels in a Cynomolgus Macaque Model. *Mol Ther.* 25, 1843-1853. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.04.003
- Mitchell, D.A.J., Lerch, T.F., Hare, J.T., Chapman, M.S. (2010) A pseudo-plaque method for infectious particle assay and clonal isolation of adeno-associated virus. *Journal of Virological Methods* 170, 9–15. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.08.004
- Mori, S., Wang, L., Takeuchi, T., Kanda, T. (2004) Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* 330 (2004) 375– 383. DOI: 10.1016/j.virol.2004.10.012
- Murakami, P., Pungor, E., Files, J., Do, L., Van Rijnsoever, R., Vogels, R., Bout, A., Mccaman, M. (2002) A single short stretch of homology between adenoviral vector and packaging cell line can give rise to cytopathic effect-inducing, helper-dependent e1-positive particles. *Human Gene Therapy* 13, 909–920.
- Mysiak, M.E. , Holthuizen, P.E., Van der Vliet, P.C. (2004) The adenovirus priming protein pTP contributes to the kinetics of initiation of DNA replication. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32, 3913–3920. DOI: 10.1093/nar/gkh726
- National Institutes of Health (2002) NIH Report: Assessment of Adenoviral Vector Safety and Toxicity: Report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee. *Human Gene Therapy* 13, 3–13
- National Institutes of Health (2016) NIH Guidelines for Research Involving Recombinant for Synthetic Nucleic Acid Molecules (NIH Guidelines). Department of Health and Human Services, National Institutes of Health
- Ng, P., Eveleigh, C., Cummings, D., Graham, F.L. (2002) Cre Levels Limit Packaging Signal Excision Efficiency in the Cre/*loxP* Helper-Dependent Adenoviral Vector System. *Journal of Virology*, 76, 4181–4189. DOI: 10.1128/JVI.76.9.4181-4189.2002
- O’Riordan, C.R., Lachapelle, A., Delgado, C., Parkes, V., Wadsworth, S.C., Smith, A.E., Francis, G.E. (2004) PEGylation of Adenovirus with Retention of Infectivity and Protection from Neutralizing Antibody in Vitro and in Vivo. *Human Gene Therapy* 10, 1349-1358. DOI: 10.1089/10430349950018021
- Palmer, D., Ng, P. (2003) Improved System for Helper-Dependent Adenoviral Vector Production. *Molecular Therapy* 8, 846-852. DOI: 10.1016/j.ymthe.2003.08.014
- Parks R.J, Graham F.L. (1997) A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging. *J Virol.*, 71:3293–3298.



Pietersen, A.M., Eb, M.M. van der, Rademaker, H.J., Wollenberg, D.J.M. van den, Rabelink, M.J.W.E., Kuppen, P.J.K., Dierendonck, J.H. van, Ormondt, H. van, Masman, D., Velde, C.J.H. van de, Eb, A.J. van der, Hoeben, R.C., Noteborn, M.H.M. (1999) Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the apoptin gene. *Gene Therapy* 6, 882–892.

Rademaker, H.J., Abou El Hassan, M.H., Versteeg, G.A., Rabelink, M.J.W.E., Hoeben, R.C. (2002) Efficient mobilization of E1-deleted adenovirus type 5 vectors by wild-type adenoviruses of other serotypes. *Journal of General Virology* 83, 1311–1314.

Reuter, J.D., Fang, X., Ly, C.S., Suter, K.K., Gibb, D. (2012) Assessment of Hazard Risk Associated with the Intravenous Use of Viral Vectors in Rodents. *Comparative Medicine* 62, 361–370.

Romano, G. (2006) The controversial role of adenoviral-derived vectors in gene therapy programs: where do we stand? *Drug News Perspect.* 19, 99-106.

Salmon, F., Grosios, K., Petry, H. (2014) Safety profile of recombinant adeno-associated viral vectors: focus on aliopogene tiparvovec (Glybera®). *Expert Rev Clin Pharmacol.* 7, 53-65. DOI: 10.1586/17512433.2014.852065

Samulski, R.J., Muzycka, N. (2014) AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes *Annu. Rev. Virol.* 1, 427–51. DOI: 10.1146/annurev-virology-031413-085355

Schiedner, G., Morral, N., Parks, R.J., Wu, Y., Koopmans, S.C., Langston, C., Graham, F.L., Beaudet, A.L., Kochanek, S. (1998) Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved *in vivo* gene expression and decreased toxicity. *Nature Genetics* 18, 180 – 183. DOI: 10.1038/ng0298-180

Schiedner, G., Hertel, S., Kochanek, S. (2000) Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Hum. Gene Ther.* 11, 2105-2116.

Schmidt, M., Voutetakis, A., Afione, S., Zheng, C., Mandikian, D., Chiorini, J.A. (2008) Adeno-Associated Virus Type 12 (AAV12): a Novel AAV Serotype with Sialic Acid- and Heparan Sulfate Proteoglycan-Independent Transduction Activity. *J. Virol.* 82, 1399–1406. DOI: 10.1128/JVI.02012-07

Sehara, Y., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., Katakai, Y., Ono, F., Takino, N., Ito, M., Ozawa, K., Muramatsu, S. (2017) Persistent Expression of Dopamine-Synthesizing Enzymes 15 Years after Gene Transfer in a Primate Model of Parkinson's Disease. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 28, 74-79. DOI: 10.1089/humc.2017.010

Seregin, S.S., Amalfitano, A. (2009) Overcoming pre-existing adenovirus immunity by genetic engineering of adenovirus-based vectors. *Expert Opin. Biol. Ther.* 9, 1521-1531.

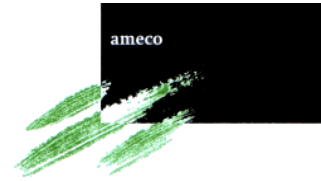
Srivastava, A. (2016) *In vivo* tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Current Opinion in Virology* 21, 75–80. DOI: 10.1016/j.coviro.2016.08.003

Srivastava, A., Carter, B.J. (2017) AAV Infection: Protection from Cancer. *Human Gene Therapy*, 28, 1-5. DOI: 10.1089/hum.2016.147

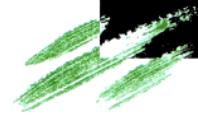
Suzuki, T., Sasaki, T., Yano, K., Sakurai, F., Kawabata, K., Kondoh, M., Hayakawa, T., Yagi, K., Mizuguchi, H. (2011) Development of a recombinant adenovirus vector production system free of replication-competent adenovirus by utilizing a packaging size limit of the viral genome. *Virus Research* 158, 154-160. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.03.026

Tenenbaum, L., Lehtonen, E., Monahan, P.E. (2003) Evaluation of Risks Related to the Use of Adeno-Associated Virus-Based Vectors. *Current Gene Therapy*, 3, 545-565.

Tiesjema, B., Hermesen, H.P.H., Van Eijkeren, J.C.H., Brandon, E.F.A. (2010) Effect of Administration Route on the Biodistribution and Shedding of Replication-Deficient HAdV-5: A Qualitative Modelling Approach. *Current Gene Therapy*, 10, 107-127



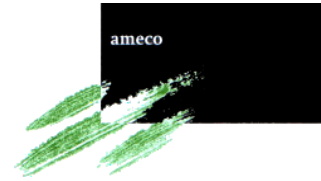
- Trapani, I., Toriello, E., Simone, S. de, Colella, P., Polishchuck, E.V., Sommella, A., Colechi, L. Rossi, S., Simonelli, F., Giunti, M., Bacchi, M.L., Polishchuck, R.S. (2015) Improved dual AAV vectors with reduced expression of truncated proteins are safe and effective in the retina of a mouse model of Stargardt disease. *Hum Mol Genet* 24, 6811-6825. DOI: 10.1093/hmg/ddv386
- Uil, T.G., Vellinga, J., De Vrij, J., Van den Hengel, S.K., Rabelink, M.J.W.E., Cramer, S.J., Eekels, J.J.M., Ariyurek, Y., Van Galen, M., Hoeben, R.C. (2011) Directed adenovirus evolution using engineered mutator viral polymerases. *Nucleic Acids Res.* 2011 39(5):e30. DOI: 10.1093/nar/gkq1258
- Virag, T., Cecchini, S., Kotin, R.M. (2009) Producing Recombinant Adeno-Associated Virus in Foster Cells: Overcoming Production Limitations Using a Baculovirus-Insect Cell Expression Strategy. *Human Gene Therapy* 20, 807–817. DOI: 10.1089=hum.2009.092
- Vliet, P.C. van der, Hoeben, R.C. (2006) Adenovirus. In: *DNA replication and human disease* (ed. DePamphilis, M.L.), pp. 645–661. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Vrij, J. de, Van den Hengel, S.K., Uil, T.G., Koppers-Lalic, D., Dautzenberg, I.J.C., Stassen, O.M.J.A., Bárcena, M., Yamamoto, M., De Ridder, C.M.A., Kraaij, R., Kwappenberg, K.M., Schilham, M.W., Hoeben, R.C. (2011) Enhanced transduction of CAR-negative cells by protein IX-gene deleted adenovirus 5 vectors. *Virology* 410, 192–200. DOI: 10.1016/j.virol.2010.10.040
- Waddington, S.N., McVey, J.H., Bhella, D., Parker, A.L., Barker, K., Atoda, H., Pink, R., Buckley, S.M.M., Greig, J.A., Denby, L., Custers, J., Morita, T., Francischetti, I.M.B., Monteiro, R.Q., Barouch, D.H., Van Rooijen, N., Napoli, C., Havenga, M.J.E., Nicklin, S.A., Baker, A.H. (2008) Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell* 132, 397-409. DOI: 10.1016/j.cell.2008.01.016
- Wold, W.S. (1993) Adenovirus genes that modulate the sensitivity of virus-infected cells to lysis by TNF. *J Cell Biochem.* 53, 329-35.
- Wold, W.S.M., Toth, K. (2013) Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy. *Curr Gene Ther.* 13, 421–433.
- Wu, Z., Asokan, A., Samulski, R.J. (2006) Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy *Molecular Therapy* 14, 316-327. DOI: 10.1016/j.ymthe.2006.05.009
- Wu, Z., Yang, H., Colosi, P. (2010) Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging. *Molecular Therapy* 18, 80-86. DOI: 10.1038/mt.2009.255
- Xu, Q., Arevalo, M.T., Pichichero, M.E., Zeng, M. (2006) A new complementing cell line for replication-incompetent E1-deleted adenovirus propagation. *Cytotechnology* 51, 133-140. DOI: 10.1007/s10616-006-9023-6
- Yang et al., 1999, Concatamerization of Adeno-Associated Virus Circular Genomes Occurs through Intermolecular Recombination, *J. Virol.* 73, 9468–9477.
- Ying, B., Toth, K., Spencer, J.F., Meyer, J., Tollefson, A.E., Patra, D., Dhar, D., Shashkova, E.V., Kuppuswamy, M., Doronin, K., Thomas, M.A., Zumstein, L.A., Wold, W.S.M., Lichtenstein, D.L. (2009) INGN 007, an oncolytic adenovirus vector, replicates in Syrian hamsters but not mice: comparison of biodistribution studies. *Cancer Gene Therapy* 16, 625–637. DOI: 10.1038/cgt.2009.6
- Ye, G-J., Budzynski, E., Sonnentag, P., Miller, P.E., Sharma, A.K., Ver Hoeve, J.N., Howard, K., Knop, D.R., Neuringer, M., McGill, T., Stoddard, J., Chulay, J.D. (2015) Human Gene Therapy Clinical Development, 26, 165-176. DOI: 10.1089/humc.2015.076
- Ye, G., Budzynski, E., Sonnentag, P., Nork, T.M., Miller, P.E., McPherson, L., Ver Hoeve, J.N., Smith, L.M., Arndt, T., Mandapati, S., Robinson, P.M., Calcedo, R., Knop, D.R., Hauswirth, W.W., Chulay, J.D. (2016a) Safety and Biodistribution Evaluation in CNGB3-Deficient Mice of rAAV2tYF-PR1.7-hCNGB3, a Recombinant AAV Vector for Treatment of Achromatopsia. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 27, 27 – 35. DOI: 10.1089/humc.2015.



Ye, G., Budzynski, E., Sonnentag, P., Nork, T.M., Miller, P.E., Sharma, A.K., Ver Hoeve, J.N., Smith, L.M., Arndt, Calcedo, R., Gaskin, C., Robinson, P.M., Knop, D.R., Hauswirth, W.W., Chulay, J.D. (2016b) Safety and Biodistribution Evaluation in Cynomolgus Macaques of rAAV2tYF-PR1.7-hCNGB3, a Recombinant AAV Vector for Treatment of Achromatopsia. Human Gene Therapy Clinical Development, 27, 36 – 48. DOI: 10.1089/humc.2015.164

Zabaleta, N., Salas, D., Paramo, M., Hommel, M., Sier-Ferreira, V., Hernandez-Alcoceba, R., Prieto, J., Bilbao, J.I., Gonzalez-Aseguinolaza, G. (2017) Improvement of Adeno-Associated Virus-Mediated Liver Transduction Efficacy by Regional Administration in Macaca fascicularis. Human Gene Therapy Clinical Development, 28, 68-73. DOI: 10.1089/humc.2016.183

Zincarelli C Soltys, S., Rengo, G., Rabinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. Mol. Ther. 16: 1073-1080. DOI: 10.1038/mt.2008.76



Bijlagen

Bijlage 1 - Inschalingsregels voor genetisch gemodificeerde virussen en virale vectoren

Bijlage 5 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen

Paragraafnummering is die van de Regeling.

**5.4.2. De combinatie van gastheercel, virale vector en donorsequentie is biologisch ingeperkt.
Dit betreft uitsluitend één van de volgende virale vectoren:**

Virale vectoren afgeleid van klasse 2 virussen:

- i. baculovirus soorten als genoemd in de tabel van § 4.1.1 van bijlage 4 van deze Regeling met p10-deletie of met polyhedrine-deletie;
- ii. modified vacciniavirus Ankara (MVA) en vacciniavirus NYVAC;
- iii. kanariepokkenvirus ALVAC en kippenpokkenvirus TROVAC;
- iv. van Semliki-forest virus afgeleide replicons waarbij het genetisch gemodificeerde replicon is geproduceerd met behulp van een meervoudig plasmiden systeem.

Virale vectoren afgeleid van klasse 3 virussen:

- i. Influenza stammen A/PR/8/34 en A/WSN/33 die zijn vervaardigd middels recombinant DNA technieken;
- ii. afgeleiden van deze stammen waarbij minimaal 6 genoomsegmenten afkomstig zijn van deze stammen en twee heterologe gensegmenten van andere Influenza A stammen. Daarbij geldt voor heterologe HA-coderende gensegmenten dat de aanwezigheid van een basische klievingsplaats is uitgesloten;
- iii. lentivirus dat wordt vervaardigd met een tweede generatie SIN of derde generatie SIN lentiviraal vectorsysteem.

Activiteiten waarbij ongekaracteriseerde donorsequenties worden gebruikt:

a. De donor bevat een schadelijk genproduct dat werkzaam kan zijn in deze gastheer.
Inschaling: de virale vector is afgeleid van een van de hierboven genoemde virussen van klasse 3: ML-II-k
klasse 2: ML-II-k.

b. De donor is een voor eukaryote cellen infectieus virus van respectievelijk klasse 4, 3 of 2, en de in de gastheer gebrachte virale sequenties kunnen leiden tot de vorming van autonoom replicerende deeltjes.

Inschaling: de virale vector is afgeleid van een van de hierboven genoemde virussen van klasse 3: respectievelijk ML-IV, ML-III, ML-II-k
klasse 2: respectievelijk ML-IV, ML-III, ML-II-k.

c. De donor is een voor eukaryote cellen infectieus virus van respectievelijk klasse 4, 3 of 2, en de in de gastheer gebrachte virale sequenties kunnen niet leiden tot de vorming van autonoom replicerende deeltjes.

Inschaling: de virale vector is afgeleid van een van de hierboven genoemde virussen van

klasse 3: respectievelijk ML-III, ML-II-k, ML-II-k
 klasse 2: respectievelijk ML-III, ML-II-k, ML-I.

d. De donor is een niet-viraal pathogeen van respectievelijk klasse 4, 3 of 2.
 Inschaling: de virale vector is afgeleid van een van de hierboven genoemde virussen van
 klasse 3: respectievelijk ML-III, ML-II-k, ML-II-k
 klasse 2: respectievelijk ML-III, ML-II-k, ML-I.

e. De donor is een organisme dat geen schadelijk genproduct bevat.
 Inschaling: de virale vector is afgeleid van een van de hierboven genoemde virussen van
 klasse 3: ML-II-k
 klasse 2: ML-I.

Activiteiten waarbij gekarakteriseerde donorsequenties worden gebruikt:

f. De sequentie bevat genetische informatie voor een schadelijk genproduct dat werkzaam kan zijn in deze gastheer.
 Inschaling: de virale vector is afgeleid van een van de hierboven genoemde virussen van
 klasse 3: ML-II-k
 klasse 2: ML-II-k.

g. De sequentie bevat, in combinatie met sequenties van de gastheer of de vector, genetische informatie voor de vorming van een voor eukaryote cellen infectieus virus van respectievelijk klasse 4, 3 of 2, en de in de gastheer gebrachte virale sequenties kunnen leiden tot de vorming van autonoom replicerende virusdeeltjes.
 Inschaling: de virale vector is afgeleid van een van de hierboven genoemde virussen van
 klasse 3: respectievelijk ML-IV, ML-III, ML-II-k
 klasse 2: respectievelijk ML-IV, ML-III, ML-II-k.

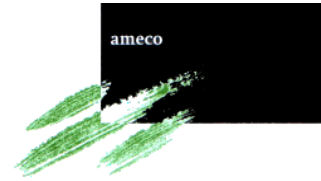
h. De sequentie bevat, in combinatie met sequenties van de gastheer of de vector, genetische informatie voor de vorming van een voor eukaryote cellen infectieus virus van respectievelijk klasse 4, 3 of 2, en de in de gastheer gebrachte virale sequenties kunnen niet leiden tot de vorming van autonoom replicerende virusdeeltjes.
 Inschaling: de virale vector is afgeleid van een van de hierboven genoemde virussen van
 klasse 3: respectievelijk ML-III, ML-II-k, ML-II-k
 klasse 2: respectievelijk ML-III, ML-II-k, ML-I.

i. De sequentie bevat geen genetische informatie die codeert voor een schadelijk genproduct.
 Inschaling: de virale vector is afgeleid van een van de hierboven genoemde virussen van
 klasse 3: ML-II-k
 klasse 2: ML-I.

5.4.3. De combinatie van gastheercel en virale vector is biologisch niet ingeperkt.

Retrovirale vectoren die vervaardigd zijn met een retroviraal vectorsysteem dat gebaseerd is op de volgende muizen gammaretrovirussen en hiervan afgeleide virussen:

- i. dl587 rev,
- ii. Moloney murine sarcoma virus (MoMSV),
- iii. Murine embryonic stem cell virus (MESV),
- iv. Murine leukemia virus (MLV),
- v. Murine stem cell virus (MSCV),



- vi. Myeloproliferative sarcoma virus (MPSV),
 - vii. PCC4-cell passaged myeloproliferative sarcoma virus (PCMV),
 - viii. Spleen focus forming virus (SFFV),
- worden in dit inschalingartikel gelijkgesteld aan een virale vector die een virus is van klasse 2 en hu-
maan pathogeen.

Activiteiten waarbij ongekaracteriseerde donorsequenties worden gebruikt:

- a. De donor bevat een schadelijk genproduct dat werkzaam kan zijn in deze gastheer.

Inschaling: de virale vector is een virus van

klasse 4: ML-IV

klasse 3: ML-III

klasse 2: ML-III.

- b. De donor is een voor eukaryote cellen infectieus virus van respectievelijk klasse 4, 3 of 2, en de in de gastheer gebrachte virale sequenties kunnen leiden tot de vorming van autonoom replicerende deeltjes.

Inschaling: de virale vector is een virus van

klasse 4: respectievelijk ML-IV, ML-IV, ML-IV

klasse 3: respectievelijk ML-IV, ML-III, ML-III

klasse 2: respectievelijk ML-IV, ML-III, ML-II-v.

- c. De donor is een voor eukaryote cellen infectieus virus van respectievelijk klasse 4, 3 of 2, en de in de gastheer gebrachte virale sequenties kunnen niet leiden tot de vorming van autonoom replicerende deeltjes.

Inschaling: de virale vector is een virus van

klasse 4: respectievelijk ML-IV, ML-IV, ML-IV

klasse 3: respectievelijk ML-III, ML-III, ML-III

klasse 2 en betreft Enterovirus C Poliovirus type 1, 2 of 3 of Enterovirus C Coxsackievirus type A1, A11, A13, A17, A19 tot en met A22, A24 en de donorsequentie is afkomstig van Enterovirus C Poliovirus type 1, 2 of 3 of Enterovirus C Coxsackievirus type A1, A11, A13, A17, A19 tot en met A22, A24: ML-II-v

klasse 2 en betreft humaan Parechovirus type 1, 2, 3, 4 of 5 en de donorsequentie is afkomstig van hu-
maan Parechovirus type 1, 2, 3, 4 of 5: ML-II-v

klasse 2 en betreft een virus uit de familie Coronaviridae, Flaviviridae, Paramyxoviridae, of Togaviridae en de donorsequentie is afkomstig van een virus uit dezelfde familie als de virale vector:

respectievelijk ML-III, ML-II-v, ML-II-v

klasse 2 en de combinatie van virale vector en virale donorsequentie is anders dan hierboven ge-
noemd:

respectievelijk ML-III, ML-II-k, ML-II-k.

- d. De donor is een niet-viraal pathogeen van respectievelijk klasse 4, 3 of 2.

Inschaling: de virale vector is een virus van

klasse 4: respectievelijk ML-IV, ML-IV, ML-IV

klasse 3: respectievelijk ML-III, ML-III, ML-III

klasse 2: respectievelijk ML-III, ML-II-k, ML-II-k.

- e. De donor is een organisme dat geen schadelijk genproduct bevat

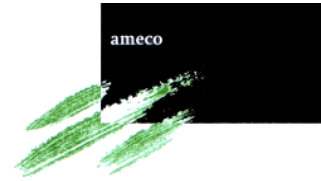
Inschaling: de virale vector is een virus van

klasse 4: ML-IV

klasse 3: ML-III

klasse 2: ML-II-k.

Activiteiten waarbij gekarakteriseerde donorsequenties worden gebruikt:



f. De sequentie bevat genetische informatie voor een schadelijk genproduct dat werkzaam kan zijn in deze gastheer.

Inschaling: de virale vector is een virus van

klasse 4: ML-IV

klasse 3: ML-III

klasse 2: ML-III. Indien afdoende is onderbouwd dat de donorsequentie niet in een schadelijk effect resulteert: ML-II-k.

g. De sequentie bevat, in combinatie met sequenties van de gastheer of de vector, genetische informatie voor de vorming van een voor eukaryote cellen infectieus virus van respectievelijk klasse 4, 3 of 2, en de in de gastheer gebrachte virale sequenties kunnen leiden tot de vorming van autonoom replicerende deeltjes.

Inschaling: de virale vector is een virus van

klasse 4: respectievelijk ML-IV, ML-IV, ML-IV

klasse 3: respectievelijk ML-IV, ML-III, ML-III

klasse 2: respectievelijk ML-IV, ML-III, ML-II-v.

h. De sequentie bevat, in combinatie met sequenties van de gastheer of de vector, genetische informatie voor de vorming van een voor eukaryote cellen infectieus virus van respectievelijk klasse 4, 3 of 2, en de in de gastheer gebrachte virale sequenties kunnen niet leiden tot de vorming van autonoom replicerende deeltjes.

Inschaling: de virale vector is een virus van

klasse 4: respectievelijk ML-IV, ML-IV, ML-IV

klasse 3: respectievelijk ML-III, ML-III, ML-III

klasse 2 en betreft Enterovirus C Poliovirus type 1, 2 of 3 of Enterovirus C Coxsackievirus type A1, A11, A13, A17, A19 tot en met A22, A24 en de donorsequentie is afkomstig van Enterovirus C Poliovirus type 1, 2 of 3 of Enterovirus C Coxsackievirus type A1, A11, A13, A17, A19 tot en met A22, A24: ML-II-v

klasse 2 en betreft humaan Parechovirus type 1, 2, 3, 4 of 5 en de donorsequentie is afkomstig van humaan Parechovirus type 1, 2, 3, 4 of 5: ML-II-v

klasse 2 en betreft een virus uit de familie Coronaviridae, Flaviviridae, Paramyxoviridae, of Togaviridae en de donorsequentie is afkomstig van een virus uit dezelfde familie als de virale vector:

respectievelijk ML-III, ML-II-v, ML-II-v.

klasse 2 en de combinatie van virale vector en virale donorsequentie is anders dan hierboven genoemd:

respectievelijk ML-III, ML-II-k, ML-II-k.

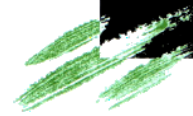
i. De sequentie bevat geen genetische informatie die codeert voor een schadelijk genproduct.

Inschaling: de virale vector is een virus van

klasse 4: ML-IV

klasse 3: ML-III

klasse 2: ML-II-k.



Bijlage 2 - (Pathogeniteits)klassen van micro-organismen

Definities in de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (Artikel 2.1)

micro-organisme van klasse 1: micro-organisme dat in ieder geval voldoet aan een van de volgende voorwaarden:

- a. het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekte-verwekkend zijn voor mens, dier of plant;
- b. het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
- c. 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;
- d. van het micro-organisme is het niet-virulente karakter door middel van adequate tests aangetoond;

micro-organisme van klasse 2: micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken;

micro-organisme van klasse 3: micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is;

micro-organisme van klasse 4: micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is;

Bijlage 3 - Inrichtings- en werkvoorschriften ML-I, ML-II, DM-I en DM-II ruimten

Deze bijlage geeft een uittreksel van de werkvoorschriften van Bijlage 9 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen.

Het uittreksel beperkt zich tot de voorschriften die in de context van dit rapport van belang zijn.

Paragraafnummering is die van de Regeling

9.1.1.1. De ML-I werkruimte

9.1.1.1.2. Werkvoorschriften ML-I

algemeen

- b. De werkruimte is beperkt toegankelijk;
- d. Pipetteren met de mond is verboden;
- f. Na besmetting worden besmette oppervlakken direct gedesinfecteerd;
- l. Tijdens de werkzaamheden zijn de deuren en de ramen van de werkruimte gesloten;
- m. Bij alle werkzaamheden wordt het ontstaan en de verspreiding van aerosolen vermeden;
- o. Passende beschermende kleding wordt gedragen. Deze kleding wordt na afloop van de werkzaamheden in de werkruimte achtergelaten;
- beëindigen werkzaamheden
- p. De werkoppervlakken worden gedesinfecteerd aan het eind van de werkzaamheden en aan het einde van iedere werkdag;
- q. Bij het verlaten van de werkruimte worden de handen gewassen met zeep of ontsmet met een gevalideerde methode;
- afval en besmet materiaal
- r. Al het biologisch afval wordt verzameld in breukvaste, lekdichte containers die gesloten kunnen worden of in een gelijkwaardige verpakking. Het afval wordt geïnactiveerd voordat het de inrichting verlaat of wordt ter onmiddellijke verbranding aangeboden aan een afvalverbrandingsinstallatie;
- s. Materiaal dat in aanraking is geweest met genetisch gemodificeerde organismen wordt geïnactiveerd of gedesinfecteerd voordat het wordt gewassen, hergebruikt of als afval afgevoerd;

9.1.1.3. De ML-II werkruimte

9.1.1.3.2. Werkvoorschriften ML-II

algemeen

- c. De deur die toegang geeft tot de werkruimte is op slot wanneer er geen personeel in de werkruimte aanwezig is;
- d. Toegang tot de werkruimte is verboden voor onbevoegden;
- e. Pipetteren met de mond is verboden;
- g. Na besmetting worden besmette oppervlakken direct gedesinfecteerd;

tijdens werkzaamheden

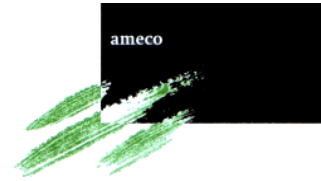
- m. Tijdens de werkzaamheden zijn de deuren van de werkruimte gesloten;
- n. Handelingen waarbij aerosolen kunnen ontstaan dan wel open handelingen met aërogeen verspreidende micro-organismen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;

beëindigen werkzaamheden

- q. De werkoppervlakken worden gedesinfecteerd aan het eind van de werkzaamheden en aan het einde van iedere werkdag;

afval en besmet materiaal

- s. Al het biologisch afval wordt verzameld in breukvaste, lekdichte containers die gesloten kunnen worden of in een gelijkwaardige verpakking. Het afval wordt geïnactiveerd voordat het de inrichting verlaat of wordt ter onmiddellijke verbranding aangeboden aan een afvalverbrandingsinstallatie;



t. Materiaal dat in aanraking is geweest met genetisch gemodificeerde organismen wordt geïnactiveerd voordat het wordt gewassen, hergebruikt of als afval afgevoerd;

overig

w. Alle werkzaamheden met dieren en planten worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet van klasse II;

z. Huisvesting van dieren en planten is in de werkruimte niet toegestaan.

9.1.1.3.3. Aanvullende voorschriften voor specifieke gevallen

9.1.1.3.3.2. Voor activiteiten met FACS apparatuur

a. De FACS apparatuur is dusdanig geconstrueerd, dat verspreiding van aërosolen wordt voorkomen.

9.1.4. Dierverblijven

9.1.4.1.2. Gesloten dierverblijf

9.1.4.1.2.2. Werkvoorschriften D-I gesloten verblijf

algemeen

c. Het verblijf is op slot wanneer zich daarin geen medewerkers bevinden;

d. Toegang tot het verblijf is verboden voor onbevoegden;

f. Het houden van dieren in het verblijf geschiedt op zodanige wijze dat geen paring kan plaatsvinden, tenzij deze door de gebruiker wordt beoogd;

h. Grote genetisch gemodificeerde zoogdieren of vogels worden gehouden in een afsluitbare ruimte binnen het verblijf. Bij het betreden van deze ruimte is de deur die toegang geeft tot het verblijf gesloten;

i. Kleine genetisch gemodificeerde zoogdieren of vogels worden gehouden in een in het verblijf geplaatste gesloten kooi. Bij het openen van de kooi is de deur die toegang geeft tot het verblijf gesloten;

tijdens werkzaamheden

l. Tijdens de werkzaamheden is de deur van het verblijf gesloten en is aan de buitenzijde van het verblijf aangegeven dat het niet betreden mag worden.

9.1.6. Dierverblijven waarin genetisch gemodificeerde micro-organismen worden toegepast

9.1.6.1. Het DM-I verblijf

9.1.6.1.2. Werkvoorschriften DM-I

algemeen

c. Het dierverblijf is afgesloten wanneer zich daarin geen medewerkers bevinden;

d. Toegang tot de werkruimte is verboden voor onbevoegden;

e. Pipetteren met de mond is verboden;

f. Kruiscontaminatie wordt voorkomen;

h. Na besmetting worden besmette oppervlakken direct gedesinfecteerd;

k. Als dieren worden gehouden in kooien of bakken, dan wel in onderdrukisolatoren, wordt daaraan een specificatie bevestigd van de erin aanwezige genetisch gemodificeerde organismen;

l. Grote zoogdieren worden gehouden in een afsluitbare ruimte binnen het verblijf. Bij het betreden van deze ruimte is de deur die toegang geeft tot het verblijf gesloten;

m. Kleine zoogdieren worden gehouden in een in het verblijf geplaatste gesloten kooi of isolator. Bij het openen van de kooi of isolator is de deur die toegang geeft tot het verblijf gesloten;

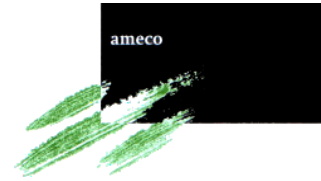
tijdens werkzaamheden

q. Tijdens de werkzaamheden zijn de deur(en) van het dierverblijf gesloten en wordt aan de buitenzijde van het verblijf aangegeven dat het niet betreden mag worden;

r. Bij alle werkzaamheden wordt het ontstaan en de verspreiding van aërosolen vermeden;

t. Passende beschermende kleding wordt gedragen. De kleding wordt na afloop van de werkzaamheden in de werkruimte achtergelaten;

beëindigen werkzaamheden



u. De werkoppervlakken worden gedesinfecteerd aan het eind van de werkzaamheden en aan het einde van iedere werkdag;

afval en besmet materiaal

w. Al het biologisch afval wordt verzameld in breukvaste, lekdichte containers die gesloten kunnen worden of in een gelijkwaardige verpakking. Het afval is geïnactiveerd voordat het de inrichting verlaat of wordt ter onmiddellijke verbranding aangeboden aan een afvalverbrandingsinstallatie;

x. Materiaal dat in aanraking is geweest met genetisch gemodificeerde organismen is geïnactiveerd of gedesinfecteerd voordat het wordt gewassen, hergebruikt of als afval afgevoerd;

9.1.6.2. Het DM-II verblijf

9.1.6.2.2. Werkvoorschriften DM-II

algemeen

c. Het dierverblijf is afgesloten wanneer zich daarin geen medewerkers bevinden;

d. Toegang tot de werkruimte is verboden voor onbevoegden;

e. Pipetteren met de mond is verboden;

f. Kruiscontaminatie wordt voorkomen;

h. Als dieren worden gehouden in kooien of bakken, dan wel in onderdrukisolatoren, is daaraan een specificatie bevestigd van de erin aanwezige genetisch gemodificeerde organismen;

i. Grote zoogdieren worden gehouden in een afsluitbare ruimte binnen het verblijf. Bij het betreden van deze ruimte is de deur die toegang geeft tot het verblijf gesloten;

j. Kleine zoogdieren worden gehouden in een in het verblijf geplaatste gesloten kooi of isolator. Bij het openen van de kooi of isolator is de deur die toegang geeft tot het verblijf gesloten;

n. Een onderdrukisolator, als bedoeld in 9.1.6.2.1.k, wordt alleen geopend in een dierverblijf als bedoeld in 9.1.6.2.1 a tot en met e. Bij het openen van de isolator is de deur die toegang geeft tot het verblijf gesloten;

tijdens werkzaamheden

q. Tijdens de werkzaamheden zijn de deur(en) van het dierverblijf gesloten en wordt aan de buitenzijde van het verblijf aangegeven dat het niet betreden worden;

r. Handelingen waarbij aerosolen kunnen ontstaan dan wel open handelingen met aërogeen verspreidende micro-organismen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;

beëindigen werkzaamheden

u. De werkoppervlakken worden gedesinfecteerd aan het eind van de werkzaamheden en aan het einde van iedere werkdag;

afval en besmet materiaal

w. Al het biologisch afval wordt verzameld in breukvaste, lekdichte containers die gesloten kunnen worden of in een gelijkwaardige verpakking. Het afval wordt geïnactiveerd voordat het de inrichting verlaat of wordt ter onmiddellijke verbranding aangeboden aan een afvalverbrandingsinstallatie;

x. Materiaal dat in aanraking is geweest met genetisch gemodificeerde organismen is geïnactiveerd voordat het wordt gewassen, hergebruikt of als afval wordt afgevoerd;

overig

z. Dieren die geen deel uitmaken van een experiment zijn niet in de werkruimte aanwezig;

aa. Bij werkzaamheden met dieren worden handschoenen gedragen;

Bijlage 4 / Appendix 4 - Survey of applicable Biosafety measures for Contained use of AAV and adenovirus vectors

In order to obtain information about the biosafety measures taken for activities under contained use in various laboratories, questionnaires and an accompanying cover letter were sent out to 4 institutes working with AAV vectors and to 16 institutes working with adenovirus vectors. Replies were received from 2 institutes (1 European, 1 from the U.S.) for AAV vectors, and 5 (4 from the EU, 1 from the U.S.) for adenovirus vectors.

The cover letter from Prof. Dr. R.C. Hoebe, chairman of the advisory board for the project, introduced the project: 'a study on the mandatory and required physical and biological containment for experiments in laboratories and animal facilities (contained use) with two vector types: replication-defective adenovirus vectors and adenovirus-associated virus vectors. In the preamble of the questionnaire it was further explained that the survey is part of a desk project that discusses the required physical and biological restrictions for experiments in contained use with two types of viral vectors: replication-defective adenovirus vectors and adenovirus-associated virus vectors (produced with the two or three plasmid approach).'

The aim of the survey was explained as 'to gather information about the level of physical containment (biosafety level) that is currently applied for laboratory experiments and activities in animal facilities. In the Netherlands biosafety level 2 (ML-II and DM-II) routinely applies to these experiments, but lower levels may be applicable, based on specific risk assessment. The project aims to present a reasoned approach to decide on the lowest necessary biosafety level that can be applied for experiments with replication defective adenovirus vectors and adeno-associated virus vectors, *that carry an insert that will not cause any harmful effects*'.

In the questionnaire, the following questions were asked:

- The type of experience of the interviewee: researcher, biosafety officer, or otherwise, e.g., member of an institutional biosafety committee.
- Type of vector(s) covered by the experience (for AAV vectors: Two or three plasmid based AAV vectors, or other AAV vectors; for adenovirus vectors: replication defective adenovirus vectors (1st – 2nd generation, i.e. $\Delta E1$, additional deletions); replication defective helper dependent adenovirus vectors, other adenovirus vectors; e.g. oncolytic adenovirus).
- Applicable legislation, e.g., government regulations or regulations imposed by an institutional biosafety committee.
- The mandatory level of physical containment that has to be applied in laboratories and in animal facilities (e.g. BSL level) for work with vectors that do not carry an insert that will cause adverse effects. Any additional requirements, e.g., the use of personal protective equipment, e.g. gloves, goggles, masks, and any criteria for vector batches: e.g. absence of replication competent wt (helper) virus.
- Does the following situation apply to the interviewee's institute, and how is the situation dealt with as regards to safety measures. It was explained that in the Netherlands, experiments can be performed in a lab without specific BSL qualification, where special equipment is located, e.g. microscopes, or cell sorters. For these labs, specific biosafety precautions and

protocols apply, for instance regarding the presence of free vector particles in samples, transport of samples to and from the lab, disinfection after use of equipment.

- Are there any ongoing discussions in the interviewee's institute about the safety precautions that have to be taken (other than the application of safe microbiological techniques) for applications of AAV or adenovirus vectors in laboratories or animal facilities?

Overview of responses; AAV vectors

One response was from a Biosafety Officer and Co-Chair of the Institutional Biosafety Committee in an institute in the U.S., one from a scientist, directly involved in working with AAV vectors in an EU institute. Both are using two or three plasmid systems for vector production.

In the U.S. institute, the safety regulations of the [NIH Guidelines](#) apply (National Institutes of Health, 2016), and the [Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories](#). The safety policy of the institute states the following about the necessary containment for AAV vectors:

BSL1/ABSL-1 Containment if:

- Transgene does not express an oncogenic protein or a toxin molecule.
- Produced in the absence of helper virus, such as adenovirus or herpes virus.
- Used in the absence of Risk Group (RG) 2 material.

Conditions:

- Do not manipulate AAV in a biological safety cabinet at the same time as RG2 materials.
- Decontaminate work areas before and after use.

BSL2/ABSL-2 Containment if at least one condition applies:

- Transgenes expresses an oncogenic protein or a toxin molecule.
- Helper virus is used to generate vectors.

Current policy: Rodents injected with non-replicating viral vectors (AAV, Ad, and Lenti) may be transferred out of the ABSL-2 containment facility to holding rooms following a 72-hour waiting period after injection. Investigators must complete a Biohazard Animal Release Form certifying that the viral vectors are safe and free of helper virus.

For practical reasons, the experiments are carried out in BSL2, and gloves and safety glasses are used, but these precautions do not appear to be mandatory in the safety policy.

Multiple core facilities outside the BSL-qualified lab may accept AAV samples for analysis. Applicable safety precautions: 'Standard transport requirements of hazardous materials. Containers must be identified with contents, sealed container to prevent release, use of cart preferred, personal protective equipment required (one hand without glove to move through doors, etc.), area decontamination when work is complete. Open work is not allowed unless aerosol protection is available (normally to protect sample as well as personnel).

In the EU institute, the EU regulations as implemented by the local government apply. Governmental guidelines state that the use of wt AAV2, as a non-pathogenic organism, requires BSL1. Non-replicating vectors derived from AAV2 also require the BSL1, unless the risk is enhanced by the nature of the insert. In that case at least BSL2 applies. In case the production of AAV vectors implies the use of wt adenovirus a safety level of BSL2 or higher applies.

The institutional guidelines provide a risk assessment of activities with viral vectors. As to AAV vectors, several serotypes (AAV1, 2, 6.2, 7. 8. 9) are used but there is no reason to suppose that these pose different risks. The guidelines state that AAV vectors are used in many university institutes under BSL1, but because the insert might enhance the risk BSL2 is applied in all cases. Safety of the transgene(s) cloned is to be considered. Disease causing genes, or oncogenes have to be handled with additional care (genes without known function should be treated alike). Reporter genes theoretically can be used in a lower BSL, but for clarity and uniformity, all manipulations are performed under BSL2/A2 conditions. (see biosafety file attached). All manipulations are performed under biosafety hoods. When impossible, application of vectors can be performed in the BSL2 rooms, under strict conditions: a protocol describing the manipulation and the containment should be written down and approved.

Infected animals are housed in animal facilities with biosafety level 2, but can be transferred to level 1 after a few days: the respondent indicates 4 days for animals that have been injected in the brain. BSL2 labs consists of different rooms to allow separated vector production and concentration, vector application for cell experiments, and application in animals. Each room has specific aprons (disposable). Shoe covers are available as well when needed.

‘When it is required to use equipment that is not in BSL2, the samples to be analysed have to be vector free (no shedding of vector should be possible). AAV vectors are extremely stable, only acidic or basic detergents can break the capsid and inactivate the particles. This procedure applies mostly to animals that are injected (brain) and are monitored over time: we have shown that after injection of rAAV no AAV could be detected on the outside of the animal that could cause possible shedding (PCR for genome copies or transduction of cells), also urine, faeces and saliva were negative.’

There are ongoing discussions about the necessary biosafety level, BSL1 or BSL2, for activities with AAV vectors. ‘Since AAV is not a disease-causing virus some people want to use it under BSL1 conditions. However, AAV is extremely stable as a particle and resists drying, and several freeze-thaw cycles without losing transduction capacity. Only basic and acidic detergents can inactivate the particles. This implies that the particles are still able to transduce cells, whereas for example enveloped HIV-based or MLV-based retroviral vectors are easily inactivated. Our research group is working under BSL2 conditions with AAV for the following reasons: 1) AAV vectors are stable vectors, simple detergent or alcohol inactivation is not sufficient. 2) AAV might not cause a human disease, but the transgene expressed by the AAV vector might. These arguments are followed by the government. Our institution follows the rules applied by the government. However, animals injected with AAV vectors can be housed in A1 after the infective period (4 days) has passed, since we cannot detect any shedding of possible particles.’

The German Central Biosafety Commission has issued a [position statement](#) on the risk assessment of human adeno-associated viruses and AAV-derived vectors:

‘1. Recombinant, AAV-derived vector particles that contain no nucleic acid sequences of AAV except for the ITRs and no potentially hazardous nucleic acid fragment, even if these are pseudotyped, are allocated to risk group 1. The classification is irrespective of which AAV the ITRs used originate from. Genetic engineering operations with genetically modified organisms that comply with these criteria are assigned to containment level 1.

2. Cells or cell lines of risk group 1, which are infected with the recombinant, AAV-derived vector particles mentioned in the previous paragraph are allocated to risk group 1. Genetic engineering operations with genetically modified organisms that comply with these criteria are assigned to containment level 1. When using cells of higher risk groups the potential hazard of the respective organisms has to be fully considered in the risk assessment.'

Overview of responses; adenovirus vectors

Response were received from 4 European interviewee and one from the U.S.

All European respondents have experience with 1st and 2nd generation adenovirus vectors and oncolytic vectors, three respondents also have experience with HD vectors. Two respondents are also active as biosafety officers. One respondent is a biological safety officer and member of a Genetic Modification Safety Committee (GMSC) in the UK. The respondent from the U.S. has experience as a member of several biosafety committees in institutes where experiments with adenovirus vectors under contained use are performed.

Regulations and guidelines:

Switzerland: A number of guidance documents are available: [Contained use: Implementation guides for the use of organisms](#); and [a number of publications from the Federal Office for the Environment](#), e.g., [Operational safety concepts according to Containment Ordinance](#). The institute uses a questionnaire to make laboratory workers aware what organism is used (contains no regulations).

Institutes in the EU: the EU regulations apply, as implemented in the national and local legislation.

In the UK, the Health and Safety Executive (HSE) is the competent authority for oversight of contained use of genetically modified organisms. The HSE has issued guidance on [Regulations for Contained use of Genetically Modified Organisms](#); [Risk assessment of genetically modified microorganisms](#); and on [Containment and control of activities involving genetically modified microorganisms](#).

Other examples of legislation: [Gesetz zur Regelung der Gentechnik](#); see [here](#) for links to the Spanish legislation.

In the U.S., the NIH Guidelines apply, but practicalities of the implementation of these guidelines may differ between institutes. The institutional regulations depend on the institutional biosafety committee and the local biosafety officer. In practice, there will be little difference between working conditions with adenovirus vectors at BSL 1 or BSL2. In both cases basic precautions of good microbiological techniques will apply, e.g., the use of safety cabinets, the use of gloves and precautions against cross contamination between experiments.

All respondents indicate that level 2 biosafety precautions apply in all cases, for laboratories as well as for animal facilities.

Further safety precautions that are mentioned are: activities are performed in a safety cabinet; a lab-coat and gloves are used, but no additional safety measures such as goggles or masks.

One respondent mentions that there are no specific criteria for vector batches: in his case 911 cells are used for amplification of E1-deleted viruses, with reduced risk of RCA.

One respondent mentions that FACS samples that are examined outside physical containment, they need to be treated with paraformaldehyde.

The respondent from the UK provided the following detailed information.

For activities with replication defective adenovirus vectors with safe insert Biosafety level 1 (CL1) applies; CL2 applies for replication competent or oncolytic adenovirus. In practice, however, most work would normally take place in CL2 facilities.

Under CL1 no extra safety precautions are necessary. However, most operators would normally wear gloves, and use a biological safety cabinet to protect the sterility of the work.

In animal facilities, use of gloves and masks is routinely required for protection from allergens.

In the respondent's lab, CL 1 procedures would now be undertaken on a downdraft table, CL2 procedures would use a biological safety cabinet for aerosol protection.

Requirement for additional safety provision is based on a specific risk assessment.

The respondent's university provides a template for risk assessment to be completed when a project is proposed (an example of a risk assessment was presented). Completed risk assessments are reviewed by the Biological Safety Officer and by members of the GMSC. Either may request modifications. When satisfied, the GMSC approves the risk assessment, to allow commencement of the project. Projects assessed as CL2 or above require notification to the national Health & Safety Executive, as specified in the GMO Contained Use Regulations.

Criteria for vector batches: no permissible RCA levels are specified by regulations; this will be part of a specific risk assessment, but the level is usually considered to be low and of little significance. There is a recommendation that transgene insertion should preferably be in the E1 region, so that it would be deleted by recombination events that generated RCA. Risk assessment would consider the scale of vector batches, and procedures for decontamination in the event of spillage. Also consider the use of sharps, whether they can be avoided, the training of workers using sharps, and their safe disposal.

Work outside a specific containment level: the risk assessment should indicate the labs or other facilities to be used. If these are not already designated for the appropriate containment level, the facility would be inspected by the University's Biological Safety Advisor, and appropriate members of the GMSC, to judge the suitability of arrangements.

Comments to the information provided in the Survey

The risks involved in activities with AAV vectors not carrying inserts that code for harmful gene products are deemed negligible. Laboratory animals are held at BSL2 safety levels for a few days after injection, after which lower containment is deemed sufficient. In practice all activities with AAV vectors may be performed at BSL2, but only to avoid confusion between experiments with AAV vectors that carry inserts coding for harmful gene products. This does not invalidate the conclusion that activities with AAV vectors carrying harmless inserts can be performed at BSL1 with negligible risk.

Activities with adenovirus vectors are almost uniformly performed at BSL2. The UK, however, chooses a more differentiated approach, based on a case-by-case risk assessment that will conclude that BSL1 containment is sufficient if the vector does not carry an insert coding for a harmful gene product. The local Biosafety Committee decides on the necessary physical containment, and decides whether certain laboratories and equipment meet the requirements for adequate physical containment.