

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Waterstaat  
Mevrouw drs. S. van Veldhoven-van der Meer  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 31 december 2018  
**KENMERK** CGM/181231-03  
**ONDERWERP** Advies klinische studie met gg-AAV bij patiënten met ernstige hemofilie A

Geachte mevrouw Van Veldhoven,


Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 18-015\_000 met de titel 'A study of BAY 2599023 (DTX201), an Adeno-associated virus (AAV) hu37-mediated gene transfer of B-domain deleted human factor VIII, in patients with severe hemophilia' van het Erasmus Medisch Centrum, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een klinische studie bij patiënten met hemofilie A. Deze patiënten hebben een genetisch defect waardoor zij te weinig stollingsfactor VIII (FVIII) aanmaken. Dit heeft als gevolg dat bloedingen langer duren of spontaan optreden. Tijdens de studie wordt een replicatie-deficiënte, genetisch gemodificeerde Adeno-associated virusvector (gg-AAV) in de bloedbaan van patiënten gebracht. Deze zogenaamde DTX201 vector infecteert de lever en brengt hier een gedeelte van het FVIII tot expressie waardoor de bloedstolling hersteld wordt.

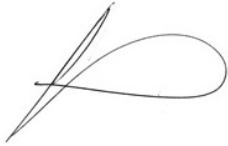
DTX201 is gebaseerd op het apathogene oudervirus AAV, waarbij alle virale genen zijn verwijderd, inclusief de genen die nodig zijn voor replicatie. Bovendien is voor replicatie van AAV ook de aanwezigheid van een helpervirus nodig. Hierdoor kan het gg-AAV wel cellen infecteren, maar zich hierin niet vermenigvuldigen.

De COGEM acht risico's voor mens en milieu bij eventuele uitscheiding van DTX201 uit de patiënt verwaarloosbaar klein. Samengevat is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met DTX201 verwaarloosbaar klein zijn.



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

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap  
Voorzitter COGEM

c.c.           Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo  
                  Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW  
                  Dr. B.M. te Riet-Schulte, Loket Gentherapie

*Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM lid prof. dr. C. M. F. Dirven niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# **Klinische studie met genetisch gemodificeerd Adeno-associated virus ter behandeling van patiënten met ernstige hemofilie A**

## **COGEM advies CGM/181231-03**

### **1. Inleiding**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag (IM MV 18-015) voor een klinische studie bij patiënten met ernstige hemofilie A. Deze patiënten maken te weinig stollingsfactor VIII (FVIII) aan, waardoor bloedingen langer duren of spontaan optreden. Tijdens deze studie wordt een replicatiedeficiënte genetisch gemodificeerde op Adeno-associated virus (gg-AAV) gebaseerde vector intraveneus aan patiënten met ernstige hemofilie A toegediend. De vector (genaamd BAY 2599023 of DTX201) bevat een expressiecassette met een gedeelte van het gen coderend voor humaan FVIII, en het vector-DNA is ingepakt in manteleiwitten met een sterk levertropisme. Naar verwachting zullen na toediening van DTX201 levercellen door de vector getransduceerd worden, en zullen deze een eiwit gaan produceren met de werkzaamheid van FVIII. Hetzelfde eiwit wordt in gezuiverde vorm in de kliniek toegepast voor de behandeling van hemofilie A en is commercieel verkrijgbaar. Het doel van de studie is het testen van de veiligheid en werkzaamheid van een eenmalige dosis van de gg-AAV vector bij patiënten met ernstige hemofilie A.

### **1.1 Hemofilie**

Hemofilie is een erfelijke ziekte waarbij de bloedstolling verstoord is omdat een van stollingsfactoren ontbreekt of in te lage hoeveelheden aanwezig is. Hierdoor duren bloedingen langer dan normaal of treden spontaan op.<sup>1</sup>

Er zijn twee vormen van hemofilie: hemofilie A en hemofilie B. Bij hemofilie A is er een tekort aan FVIII, bij hemofilie B is er een tekort aan factor IX (FIX). De tekorten zijn het gevolg van mutaties of deleties in het gen voor één van deze factoren. Deze genen liggen op het X chromosoom, waardoor de ziekte voornamelijk bij mannen voorkomt. Vrouwen zijn draagster van de ziekte, maar kunnen ook een verlaagd stollingsfactorgehalte hebben. In Nederland zijn er ongeveer 1600 hemofilie patiënten. Hemofilie A komt vijf keer vaker voor dan hemofilie B.<sup>1</sup>

De ernst van hemofilie kan variëren van ernstig, matig ernstig tot mild. Bij ernstige hemofilie is er minder dan 1% van de normale hoeveelheid stollingsfactor in het bloed aanwezig. Deze vorm wordt gekenmerkt door spontane bloedingen in spieren en gewrichten die bij onvoldoende behandeling tot blijvende schade kunnen leiden. Van matig ernstige hemofilie is sprake als er nog tussen de 1 en 5% van de normale hoeveelheid stollingsfactor aanwezig is. Bij deze vorm komen spontane bloedingen veel minder vaak voor en is er doorgaans een aanwijsbare oorzaak, zoals een ongeval of overbelasting. Bij de milde vorm ligt het percentage aan bloedstollingsfactor tussen de 5 en 50%.<sup>1,2</sup>

Bij gezonde personen worden FVIII en FIX in de lever gesynthetiseerd. De stollingsfactoren zijn in de bloedbaan aanwezig. De huidige behandeling van hemofiliepatiënten bestaat uit intraveneuze toediening van de ontbrekende stollingsfactoren (2 tot 3 keer per week). De factoren zijn afkomstig uit het bloedplasma van donoren of worden via recombinant-DNA technieken gesynthetiseerd.<sup>2,3</sup>

### **1.2 Adeno-associated virus**

Adeno-associated virussen (AAV's) behoren tot de familie *Parvoviridae* en zijn onder verschillende soorten binnen het genus *Dependoparvovirus* ondergebracht.<sup>4</sup> Er bestaan diverse AAV serotypes, die onder meer verschillen in gastheerspecificiteit en weefsel tropisme.<sup>5,6</sup> *Adeno-associated dependoparvovirus A* is de typesoort van het genus *Dependoparvovirus*, en omvat de types AAV-1 tot en met AAV-4, AAV-6 tot en met AAV-13, en AAV-S17.<sup>4</sup>

AAV's zijn enkelstrengs DNA-virussen met een genoom van circa 5 kb.<sup>6</sup> Op het genoom bevinden zich twee genen: *rep* en *cap*. Het *rep* gen codeert voor de vier replicase eiwitten (Rep) die een rol spelen bij de virusreproductie, de expressie van de structurele eiwitten, en de integratie van het virusgenoom in het genoom van de gastheer. Het *cap* gen codeert voor de drie capsid-eiwitten (VP1, VP2 en VP3) die het genoom omhullen.<sup>6</sup> Daarnaast bevindt zich binnen het *cap* gen 'nested' een alternatief 'open reading frame' (ORF) dat codeert voor het 'assembly activating protein' (AAP).<sup>7,8</sup> Van AAP wordt verondersteld dat het een rol speelt bij de assemblage van het capsid.

De *rep* en *cap* genen worden geflankeerd door twee 'inverted terminal repeats' (ITR's). Deze fungeren als start van de DNA-replicatie en als het 'packaging' signaal (inpakken van het virale genoom in de capsid-eiwitten). Daarnaast zijn zij betrokken bij de integratie van het virale DNA in het chromosoom van de gastheer.<sup>9</sup>

AAV is replicatiedeficiënt. Voor efficiënte reproductie is co-infectie met een helpervirus nodig, zoals een adenovirus of een herpesvirus.<sup>6,9</sup> Als er geen ander virus in de cel aanwezig is, blijft AAV latent intra- of extrachromosomaal in de celkern aanwezig in afwachting van infectie door een helpervirus.<sup>7,9,10,11</sup> Integratie van het AAV genoom in het chromosoom is locatie-specifiek, en vindt meestal plaats in de lange (q) arm van chromosoom 19 ter hoogte van de AAVS1 site.<sup>10,12</sup> Bij ongeveer 0,1% van de AAV-2 vectordeeltjes treedt integratie in het gastheergenoom op.<sup>13,14</sup>

AAV kan verschillende warmbloedige dieren, inclusief de mens, infecteren.<sup>9</sup> Infecties met AAV komen wereldwijd en frequent voor (80% van de humane populatie is seropositief voor AAV-2), maar gaan voor zover bekend niet gepaard met ziekteverschijnselen.<sup>15</sup> Overdracht van het virus vindt waarschijnlijk plaats via de respiratoire of gastro-intestinale route.<sup>6</sup> De COGEM heeft in 2018 de pathogeniteitsklasse-indeling van *Adeno-associated dependoparvovirus A* heroverwogen en het virus als niet-ziekteverwekkend ingedeeld in de laagste pathogeniteitsklasse.<sup>16</sup>

### **1.3 Gg-AAV vector DTX201**

Tijdens deze klinische studie wordt gebruik gemaakt van een gg-AAV vector gebaseerd op AAV-2 en AAV-hu37. Beide virussen zijn subtypes van *Adeno-associated dependoparvovirus A*.<sup>4,17</sup>

Voor de constructie van de vector zijn de genen die coderen voor de Rep en capsid-eiwitten vervangen door een expressiecassette met het gen coderend voor humaan FVIII. Uit het FVIII gen is de sequentie coderend voor het B-domein tussen de aminozuren serine (S) op positie 672 en glutamine (Q) op positie 1657, verwijderd (hFVIIIco SQ of 'B-domain deleted' (BDD) hFVIII).<sup>18</sup> De aanvrager geeft aan dat het gen codon-geoptimaliseerd is ten einde een verhoogde eiwitexpressie te bewerkstelligen en het aantal mogelijke alternatieve open leesramen te verminderen.

Het hFVIIIco SQ coderende gen wordt voorafgegaan door een leverspecifiek van de muis afkomstig transthyretine (TTR) 'enhancer element' en een leverspecifieke humane TTR promotor ten

einde een hoog expressieniveau van hFVIIIco SQ in de lever te verkrijgen. Achter het gen is een poly-A terminatorsequentie (pA) afkomstig van het humane  $\alpha$ -2 globine gen ingebracht. Tussen de bovengenoemde elementen in de BDD hFVIII expressiecassette liggen enkele niet-functionele korte sequenties. Dit zijn overblijfselen als gevolg van de assemblage van het construct, die geen coderende sequenties bevatten. De expressiecassette wordt geflankeerd door ITR-sequenties afkomstig van AAV-2. Het vectorgenoom (ITR's en expressiecassette) heeft een grootte van ca. 5,1 kilobasen (kb).

Het vectorgenoom, wordt omhuld door capsid-eiwitten afkomstig van AAV-hu37 waardoor er een AAV-2/-hu37 gepseudotypeerd vectordeeltje ontstaat. AAV-hu37 behoort tot hetzelfde subtype AAV's als AAV-8 ('clade E').<sup>17</sup> AAV vectoren die gebaseerd zijn op 'clade E' AAV's hebben een sterk levertropisme en kunnen de lever efficiënt transduceren wanneer ze intraveneus toegediend worden.<sup>19,20,21</sup>

#### **1.4 Productie van DTX201**

Voor de productie van DTX201 wordt gebruik gemaakt van een 'packaging' plasmide, de HeLa S3 productiecellijn 21C5, en een helpervirus.<sup>22</sup> Eerst wordt cellijn 21C5 stabiel getransfecteerd met packaging plasmide pDTX.hFVIIIco-SQ.201, waarbij per cel ongeveer 12 plasmide kopieën aanwezig zijn. Het plasmide bevat de volgende vijf elementen:

- AAV-2/hFVIIIco SQ vectorgenoom (BDD hFVIII expressiecassette) bestaande uit het muizen TTR enhancer element, de levercel-specifieke humane TTR promotor, de hFVIIIco SQ coderende sequentie, het humane  $\alpha$ -2 globine poly-A signaal, en de AAV-2 ITR's;
- een AAV-2-*rep*/AAV-hu37-*cap* expressiecassette met een AAV p5 promotor;
- een puromycine resistentiegen (*Puro<sup>R</sup>*) onder controle van een Simian virus 40 (SV40) promotor en met een SV40 poly-A signaal;
- een kanamycineresistentiegen (*Kan<sup>R</sup>*) onder controle van een bacteriële p3 promotor;
- Een bacteriële 'origin of replication'.

Vervolgens wordt de getransfecteerde 21C5 'master' celbank (MC846002) geïnfecteerd met een commercieel verkrijgbaar wild-type humaan adenovirus type 5 (HAdV5) als helpervirus ten einde de DTX201 vector te produceren. De HAdV5 batch voldoet aan de maatstaven voor Good Manufacturing Practice (GMP) bij toepassingen in klinische studies.

Na de productie wordt de gg-vector geogst, behandeld met Benzonase om niet in vectordeeltjes ingepakte DNA-fragmenten af te breken, en de ruwe fractie met behulp van verschillende technieken gezuiverd. Tevens ondergaat de batch een hitte-inactivatie stap om HAdV5 te inactiveren. Gezuiverd DTX201 wordt vervolgens met behulp van een gevalideerde assay gecontroleerd op de afwezigheid van infectieus HAdV5 aan de hand van de detectie van een cytopathologisch effect op HEK293 cellen (acceptatiecriterium: <3 infectious units/  $1 \times 10^{12}$  vector genomen (vg)). Daarnaast wordt door middel van gevalideerde qPCR's gecontroleerd op de afwezigheid van het *EIA* gen van HAdV5, HeLa cel DNA, en het Humaan papilloma virus (HPV18) E6/E7 DNA fragment dat in de HeLa cellijn aanwezig is (detectielimieten (LOD) respectievelijk 10 pg per 5  $\mu$ l, 10 pg per 5  $\mu$ l, en 100 kopieën per 5  $\mu$ l).

Per vectorbatch wordt de DTX201 titer bepaald met behulp van een qPCR specifiek voor de codon-geoptimaliseerde hFVIIIco SQ coderende sequentie. De titer zal  $\geq 5 \times 10^{12}$  vg/mL bedragen. DTX201 wordt geproduceerd door Lonza Viral-Based Therapeutics, Houston, TX, USA. De productie maakt geen deel uit van de onderhavige vergunningaanvraag.

## **2. Eerdere COGEM adviezen over klinische studies met gg-AAV vectoren**

De COGEM heeft verschillende keren geadviseerd over de mogelijke risico's voor mens en milieu van klinische studies met gg-AAV vectoren. In 2005 betrof het een studie met een gg-AAV vector die codeert voor het lipoproteïne lipase (LPL) ter behandeling van patiënten met een LPL deficiëntie.<sup>23</sup> In 2013 betrof het een studie met een gg-AAV vector die codeert voor het 'sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase' (SERCA2a) ter behandeling van patiënten met hartfalen.<sup>24</sup> In 2015 en 2018 heeft de COGEM geadviseerd over een fase I/II klinische studie met gg-AAV waar een expressiecassette voor humaan stollingsfactor IX (hFIX) was ingebracht ten behoeve van de behandeling van patiënten met matig ernstige tot ernstige hemofilie B.<sup>25,26</sup> In 2016 heeft de COGEM geadviseerd over een fase I klinische studie met een gg-AAV vector die codeert voor het humane Interferon- $\beta$  (hIFN- $\beta$ ) ter behandeling van patiënten met reumatoïde artritis.<sup>27</sup> Tot slot heeft de COGEM in 2017 geadviseerd over een klinische studie met een gg-AAV vector die codeert voor het hUGT1A1 eiwit ter behandeling van patiënten met het Crigler-Najjar syndroom.<sup>28</sup>

In alle zes studies achtte de COGEM de kans op uitscheiding van de gg-AAV vector aanwezig. Om de eventuele nadelige effecten van uitscheiding te minimaliseren, adviseerde de COGEM enkele aanvullende voorschriften te hanteren, of stemde zij in met de voorgestelde voorschriften van de aanvrager:

- Patiënten dienen effectieve anticonceptie in combinatie met een barrièremiddel in acht te nemen gedurende de eerste drie maanden na behandeling of totdat er na een periode van 75 dagen gedurende drie opeenvolgende testen geen vector-DNA in het sperma kan worden aangetoond;
- De vector zal niet toegepast worden wanneer er klinische aanwijzingen zijn voor een actieve virale infectie;
- De behandelde patiënten worden uitgesloten van donatie van bloed, cellen en weefsels.

Onder navolging van bovengenoemde voorschriften en op basis van het apathogene en replicatie-deficiënte karakter van de gebruikte gg-AAV-vectoren, achtte de COGEM de milieurisico's ten gevolge van uitscheiding verwaarloosbaar klein, en adviseerde zij positief over de zes klinische studies.

Overigens plaatste de COGEM bij het meest recente advies uit 2018 een kanttekening bij het voorschrift over het niet toepassen van de gg-AAV vector als er klinische aanwijzingen zijn voor een actieve virale infectie.<sup>26</sup> Zij is van oordeel dat dit voorschrift uit milieurisico-overwegingen niet noodzakelijk is omdat de kans verwaarloosbaar klein is dat na toediening van de gg-AAV vector een drievoudige infectie van één cel kan optreden met de gg-AAV vector, wildtype AAV en helpervirus. Daardoor is de COGEM van oordeel dat ook de kans verwaarloosbaar klein is dat de gg-AAV vector

verder verspreid kan worden. Deze inschatting wordt ondersteund door het feit dat er in de natuur tijdens AAV-infecties nog nooit defectieve AAV-deeltjes zijn waargenomen, hetgeen een aanwijzing is dat deficiënte vectorsequenties niet gecompenseerd en ingepakt zullen worden door wildtype AAV.

Het laatste voorschrift over de donatie van bloed, cellen en weefsels werd bij de studies met hemofilie- en reumapatiënten niet geadviseerd omdat deze patiënten hiervan al uitgesloten zijn.<sup>25,26,27</sup>

### **3. Informatie over de klinische studie**

De studie met DTX201 zal plaatsvinden in het Erasmus Medisch Centrum te Rotterdam. Tijdens de studie ontvangen maximaal 50 patiënten éénmalig een startdoserings DTX201 van maximaal  $3,0 \times 10^{13}$  vg/kg. De vector wordt toegediend via een intraveneuze katheter in een perifere ader.

De infuuszak met het ggo wordt in een veiligheidskabinet van klasse II voorbereid. Tijdens deze voorbereiding dragen de medewerkers beschermende kleding en handschoenen. De infuuszak wordt in een gesloten lekdichte container naar de kamer van de patiënt gebracht waar het ggo zal worden toegediend. Tijdens het toedienen draagt het medisch personeel beschermende kleding. Vorming van aerosolen en morsen zal zoveel mogelijk worden voorkomen. Hierna wordt de behandelkamer gedecontamineerd met een desinfectans (250 ppm chloor oplossing). Wanneer er vloeistof gemorst wordt, wordt dit met een 1000 ppm chlooroplossing schoongemaakt.

De patiënten blijven minimaal 8 uur na toediening in het ziekenhuis en worden 52 weken gemonitord. De aanvrager zal op verschillende tijdstippen bloed-, feces-, semen-, speeksel- en urinemonsters afnemen om de eventuele aanwezigheid van vector DNA (DTX201) te bepalen. Daartoe worden de monsters ter analyse naar een GLP-gecertificeerd laboratorium gebracht. De detectielimiet (LOD) van de analysemethode om het vector DNA aan te tonen bedraagt 20 vg per reactie. Bloedmonsters zullen gedurende 52 weken worden afgenomen totdat drie opeenvolgende monsters negatief testen voor vector DNA. Feces-, speeksel- en urinemonsters worden tot maximaal week 12 afgenomen of totdat drie opeenvolgende monsters negatief testen voor vector DNA. Semenmonsters zullen vanaf week 6 tot aan maximaal week 12 worden afgenomen, of totdat één monster negatief test voor vector DNA. Tijdens de afname worden er naast de standaard hygiënevoorschriften geen aanvullende maatregelen gehanteerd.

Bij de selectie van patiënten voor de studie worden door de aanvrager de volgende inclusie- en exclusiecriteria gehanteerd:

- Patiënten die seksueel actief zijn, dienen effectieve contraceptie in de vorm van een fysiek barrièremiddel in acht te nemen totdat een monster negatief test voor vector DNA met een maximum tot week 12 na toediening;
- Patiënten met een actieve hepatitis B of C infectie (of met een geschiedenis van behandeling tegen deze infecties), of een andere actieve infectie (onder meer viraal, bacterieel, parasitair) worden uitgesloten van de studie;
- Patiënten met een geschiedenis van HIV infectie en een CD4+ 'cellcount' van  $<200$  cellen/mm<sup>3</sup> worden uitgesloten van de studie; individuen die HIV-positief zijn, maar met

een stabiele adequate CD4+ 'cellcount', een niet detecteerbare 'viral load' en onder behandeling van een retrovirale therapie, kunnen wel worden geïncubeerd;

De aanvrager merkt op dat, aangezien hemofiliepatiënten al zijn uitgesloten van donatie van bloed, cellen en weefsels, dit exclusie criterium niet in de aanvraag is opgenomen.

#### **4. Overweging**

In de onderhavige aanvraag wordt de replicatiedeficiënte vector DTX201 toegediend aan patiënten met ernstige hemofilie A. Mogelijke risico's die hierbij kunnen optreden, hebben betrekking op de pathogeniteit van het ggo, de mogelijke verspreiding van het ggo in het milieu, en de eventuele vorming van nieuwe recombinante virussen. Door verspreiding zouden andere personen dan de deelnemende patiënten geïnfecteerd kunnen worden met het ggo of met een recombinant virus

##### **4.1 Pathogeniteit**

De virale vector DTX201 is gebaseerd op het niet pathogene oudervirus *Adeno-associated dependoparvovirus A*. Dit virus kan zich, zoals alle AAV-s, alleen repliceren in de aanwezigheid van een helpervirus.<sup>16</sup>

###### **4.1.1 Vector**

De gg-vector bevat de ITR's van wild-type AAV-2. Deze zijn nodig voor het inpakken van het genetische materiaal in het vectordeeltje. De *rep* en *cap* sequenties zijn uit het virus verwijderd en vervangen door een BDD hFVIII expressiecassette, die een gedeelte van humaan FVIII tot expressie brengt. Door het ontbreken van de Rep- en capsid-eiwitten kan DTX201 zich ook in aanwezigheid van een helpervirus niet meer in geïnfecteerde cellen repliceren. Ook integratie in chromosoom 19 en de kans op insertionele mutagenese is daarmee verwaarloosbaar klein.

Bovenstaand in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat gg-vector DTX201 geattenuëerd en biologisch ingeperkt is, en daardoor niet in staat is zich in het milieu te verspreiden.

###### **4.1.2 Transgen**

FVIII komt van nature voor in het bloed van de mens en wordt geproduceerd in de lever. Bij hemofilie A patiënten ontbreekt de stollingsfactor of is deze in te lage hoeveelheden aanwezig. Deze patiënten worden behandeld door hFVIII intraveneus toe te dienen. De aanvrager geeft aan dat direct intraveneus gebruik van een recombinant verkregen FVIII product, dat identiek is aan het eiwit dat door DTX201 tot expressie wordt gebracht, geen speciale schadelijke effecten laat zien.<sup>29</sup>

DTX201 is gepseudotypeerd met capsid-eiwitten van AAV-hu37, dat een sterk levertropisme kent. Het hFVIIIco SQ transgen in DTX201 staat onder controle van een leverspecifieke enhancer- en promotorsequentie. Daardoor is expressie van het transgen beperkt tot de lever. De aanvrager geeft aan dat een dosis DTX201 van  $3,0 \times 10^{13}$  vg/kg toegediend aan muizen, tot aan een leeftijd van drie maanden goed werd getolereerd. Ook een dosis DTX201 van  $1,2 \times 10^{13}$  vg/kg toegediend aan makaken werd gedurende 61 weken goed getolereerd.



De aanvrager merkt op dat het doel van de klinische studie tot doel heeft het gehalte aan functioneel FVIII te normaliseren tot een maximum van 150%. Op het moment dat dit maximum wordt overschreden, bijvoorbeeld ten gevolge van overexpressie, zal de toe te dienen dosis DTX201 zodanig worden aangepast dat het maximale gehalte onder de 150% blijft.

Ten gevolge van de transductie van de levercellen kan een cellulaire immuunrespons optreden, waardoor het transaminasegehalte in de bloedbaan tijdelijk verhoogt.<sup>20,21,30,31</sup> De aanvrager geeft aan dat deze transaminaseverhoging geen klinische gevolgen heeft, maar wel een indicatie geeft dat de effectiviteit van de gentherapie ernstig wordt gecompromitteerd. De aanvrager geeft aan dat de immuunrespons goed behandeld kan worden met corticosteroiden.<sup>31,30,32,33</sup>

Bij sommige patiënten kan er na toediening van FVIII een ernstige complicatie optreden, vanwege het ontstaan van neutraliserende antilichamen gericht tegen de stollingsfactor.<sup>34,35</sup> Deze complicatie is gerelateerd aan genetische factoren, waaronder de aard van de mutaties in het gen dat codeert voor FVIII bij deze patiënten. De aanvrager geeft aan dat tijdens de studie de geïncludeerde patiënten gemonitord zullen worden op het verschijnen van deze antilichamen.

Het bovenstaande in overweging nemende, signaleert de COGEM dat het in DTX201 ingebrachte transgen bij bepaalde hemofilie A patiënten ernstige complicaties kan veroorzaken omdat na intraveneuze toediening neutraliserende antistoffen tegen FVIII kunnen ontstaan. De COGEM acht echter de kans dat dit nadelige gevolgen heeft voor derden, bijvoorbeeld bij prikaccidenten of morsen tijdens de toediening, verwaarloosbaar klein is, vanwege het feit dat deze in dat geval aan doses blootgesteld worden die vele orden van grootte lager liggen. De COGEM beschouwt daarom een schadelijk effect ten gevolge van blootstelling aan het transgen als een risico voor de patiënt, maar niet als een risico voor het milieu.

#### **4.2 Moleculaire karakterisering**

De aanvrager heeft DTX201 genotypisch gekarakteriseerd door het packaging plasmide en het DTX201 vectorgenoom te sequencen. De sequentie van het AAV-hu37 *cap* gen op het packaging plasmide is voor 99,91% identiek aan de beoogde AAV-hu37 wild-type sequentie. Er zijn weliswaar twee nucleotidenwijzigingen in het gen aanwezig, maar dit betreffen 'silent' mutaties. Hierdoor is de aminozuursequentie van de capsid-eiwitten van DTX201 100% identiek aan die van wild-type AAV-hu37. De AAV-2 gerelateerde sequenties op het plasmide (het AAV-2 *rep* gen en de AAV-2 ITR's) zijn 100% identiek aan de wild-type AAV-2 sequenties. Ook de sequentie van de BDD hFVIII expressiecassette (enhancer, promotor, hFVIIIco SQ coderende sequentie, poly A signaal) is 100% identiek aan de beoogde sequentie.

De aanvrager geeft aan dat het DTX201 vectorgenoom niet in zijn geheel gesequenced kan worden vanwege de vorming van secundaire structuren in de ITR-sequenties. De sequentiegegevens die wel door de aanvrager verkregen konden worden (sequentie van de expressiecassette), lieten geen verschil zien met de corresponderende sequentiegegevens op het plasmide.

De capsid-eiwitten van DTX201 zijn fenotypisch gekarakteriseerd. Met behulp van een Western blot is het bandenpatroon vergeleken met dat van gekwalificeerde referentiestandaarden ('molecular

weight markers' en capsid-eiwitten van AAV-2). De aanvrager geeft aan dat het detecterende antilichaam gericht is tegen een domein dat binnen veel AAV-serotypes geconserveerd is en verwijst hiervoor naar een publicatie van Wobus *et al.*<sup>36</sup> Verder geeft de aanvrager aan dat de bandenpatronen van de capsid-eiwitten van DTX201 en AAV-2 met elkaar overeenkomen, en dat een andere Western blot met AAV-8 capsid-eiwitten hetzelfde bandenpatroon vertoont.

De aanvrager heeft daarnaast DTX201 *in vitro* fenotypisch gekarakteriseerd door aan de hand van een ELISA te bevestigen dat na transfectie van een humane cellijn met DTX201, het hFVIIIco SQ coderende gen tot expressie komt.

De COGEM merkt op dat in de publicatie van Wobus *et al.*<sup>36</sup> capsid-eiwitten van AAV-2, AAV-3, AAV-4 en AAV-5 zijn geanalyseerd, en dat AAV-hu37 een subtype is van AAV-4.<sup>4,17</sup> Naar het oordeel van de COGEM toont de Western blot aan dat gg-vector DTX201 AAV capsid-eiwitten bevat, maar niet dat het daadwerkelijk AAV-hu37 capsid-eiwitten betreffen.

Op basis van de hierboven beschreven genotypische en fenotypische karakterisering, is de COGEM echter van oordeel dat DTX201 voldoende moleculair gekarakteriseerd is.

#### **4.3 Uitscheiding**

Tijdens deze studie worden behandelde patiënten niet in isolatie gehouden en blijven ze minimaal 8 uur in het ziekenhuis. Hierdoor kan het ggo zowel in het ziekenhuis als in de thuissituatie of elders in het milieu worden uitgescheiden.

Op AAV gebaseerde gg-vectoren die intraveneus worden toegediend, kunnen via feces, speeksel, sperma en urine worden uitgescheiden.<sup>20,21</sup> Verscheidene (pre-)klinische studies bij mens en dier met AAV vectoren die vergelijkbaar zijn met DTX201, laten zien dat 'shedding' van AAV vectordeeltjes gedurende meerdere weken na behandeling plaatsvindt, maar in de loop van de tijd afneemt omdat de vectoren replicatiedeficiënt zijn.<sup>21,37,38,39,40</sup> Data van een langlopende klinische vervolgstudie uit 2014, waarin een op AAV-8 gebaseerde gg-vector eenmalig intraveneus werd toegediend aan patiënten met hemofilie B, laten zien dat de mate van uitscheiding afhankelijk is van de toegediende dosis, en dat bij de hoogste dosering ( $2 \times 10^{12}$  vg/kg) 7 weken na toediening geen vector meer werd uitgescheiden.<sup>21</sup> De hoogste dosering van een gg-AAV vector tot nog toe betreft een studie met een AAV-5 vector ter behandeling van hemofilie A.<sup>31</sup> Hierbij werd als maximale dosering  $6 \times 10^{13}$  vg/kg toegediend. De mate van uitscheiding was het hoogst in week 1 tot 4, en nam geleidelijk af. In week 52 werd vector DNA nog gedetecteerd in het bloed, maar werd niet meer uitgescheiden in urine (uitscheiding tot 28 weken), en sperma en speeksel (beiden uitscheiding tot week 52). Uitscheiding in feces was niet volledig geklaard op week 52.

Met betrekking tot de uitscheiding van de gg-AAV vector via sperma merkt de aanvrager op dat bij de twee patiënten, waarbij de gg-AAV-vector nog in week 52 in het sperma werd aangetroffen,<sup>31</sup> de vector zich niet in de spermacellen bleek te bevinden. Bij een klinische studie met een op AAV-2 gebaseerde gg-vector bleek uit nader onderzoek naar de motiele fractie van het sperma dat er daarin geen vectorgenoom aanwezig was.<sup>41</sup> Deze bevinding werd ondersteund door een *in vivo* studie bij konijnen, waarbij vectorgenoom voornamelijk werd aangetoond in de vloeistof en niet in de motiele

fractie.<sup>42</sup> Tevens werd bij deze studie aangetoond dat er na vier dagen geen infectieuze vectordeeltjes meer in het sperma detecteerbaar waren, en dat er na verloop van tijd in nieuw gevormde spermacellen geen vectorgenoom werd gedetecteerd. Dit laatste wijst er op dat op het moment van toediening van de vectordeeltjes geen onomkeerbare transductie van nog niet uitgerijpte spermacellen had plaatsgevonden. Recent is in de literatuur beschreven dat AAV latent persisteert in bepaalde lymfocyten en daardoor in de cellulaire fractie van sperma aanwezig kan zijn.<sup>43,44</sup>

De aanvrager heeft aan de hand van een *in vivo* studie bij muizen de distributie van DTX201 in bloed en testes onderzocht. Bij intraveneuze toediening van  $3,0 \times 10^{13}$  vg/kg werd na 92 dagen in beide weefsels nog vectorgenoom aangetroffen.

Op basis van de literatuurgegevens over gg-AAV-vectoren,<sup>21,31,37,38,39,40</sup> en de hierboven vermelde *in vivo* studie met DTX201 bij muizen stelt de aanvrager dat uitscheiding van DTX201 afhankelijk is van de toegediende dosis, de hoeveelheid geleidelijk af zal nemen, en dat gg-vectorgenoom in ieder geval tot 92 dagen na toediening in verschillende weefsels aanwezig zal blijven.

De COGEM merkt op dat wanneer er vector DNA in lichaamsvloeistoffen of weefsels wordt aangetoond, dit niet betekent dat het ook daadwerkelijk infectieus DTX201 betreft. Daarnaast merkt de COGEM op dat de kans op de aanwezigheid van een infectieuze gg-AAV-vector verder wordt verkleind op het moment dat de patiënt neutraliserende antilichamen tegen het capside heeft ontwikkeld.<sup>21</sup>

Op basis van bovenstaande gegevens concludeert de COGEM dat op AAV gebaseerd vector DNA enkele weken tot maanden in sperma aangetoond kan worden. Dit is een tijdelijk fenomeen. Het vectorgenoom is aanwezig in de vloeistof en niet in de spermacellen. De COGEM acht het daarnaast onwaarschijnlijk dat er kiembaantransmissie optreedt omdat op AAV gebaseerde vectoren niet efficiënt integreren in het genoom, maar voornamelijk episomaal aanwezig zijn en hierdoor niet persistenten in actief replicerende cellen. Tevens is kiembaantransmissie van AAV niet in de literatuur beschreven.<sup>37,45,46,47,48</sup>

Alle bovenstaande gegevens in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein wanneer tijdens de studie DTX201 uitgescheiden wordt omdat 1) de gg-vector apathogeen is, 2) deze zich vanwege zijn replicatiedeficiënte eigenschappen niet kan verspreiden, en 3) de kans op kiembaantransmissie verwaarloosbaar klein is.

De aanvrager stelt als voorwaarde dat patiënten die seksueel actief zijn, effectieve anticonceptie in de vorm van een fysiek barrièremiddel in acht nemen. Hoewel de COGEM de kans op kiembaantransmissie verwaarloosbaar klein acht, kan zij met het voorschrift van de aanvrager instemmen ten einde de kans op onnodige blootstelling van derden aan de gg-vector te minimaliseren.

#### **4.4 Recombinatie en complementatie**

DTX201 wordt geproduceerd in de van HeLa S3 afgeleide cellijn 21C5 die stabiel getransfecteerd is met het pDTX.hFVIIIco-SQ.201 plasmide. Dit plasmide bevat vier verschillende expressiecassettes,

waaronder een cassette die codeert voor het DTX201 vectorgenoom, en een cassette die codeert voor de AAV-2 Rep- en AAV-hu37 capsid-eiwitten. Tijdens het productieproces wordt gebruik gemaakt van een HAdV5 helpervirus. Na productie ondergaat elke vectorbatch een Benzonase behandeling, een hitte-inactivatiestap en verschillende zuiveringsstappen. Hierna wordt de batch gecontroleerd op de afwezigheid van infectieus HAdV5, gastheercel DNA-sequenties (zoals 18S en E6/E7 DNA-fragmenten), en productiesysteem gerelateerde DNA-sequenties afkomstig van de *rep*, *cap*, *Puro<sup>R</sup>*, *Kan<sup>R</sup>* en *E1A* genen.

Tijdens het productieproces van DTX201 of na toediening van DTX201 aan de patiënt zouden door recombinatie 'replicatiecompetent' AAV (rcAAV),<sup>1</sup> of door complementatie gg-AAV-vectordeeltjes met gastheercelsequenties of productiesysteem-gerelateerde sequenties kunnen ontstaan. Dit wordt hieronder nader toegelicht.

#### 4.4.1 Recombinatie in de vectorbatch

De aanvrager geeft aan dat het productieproces van DTX201 plaatsvindt onder GMP condities en dat voorafgaand aan het productieproces de 21C5 cellijn en HAdV5 virusbatch door middel van PCR gecontroleerd wordt op de afwezigheid van wild-type AAV. Hierdoor acht hij het hoogst onwaarschijnlijk dat er homologe recombinatie optreedt tussen de verschillende van AAV afkomstige sequenties in de DTX201 vector en contaminerend wild-type AAV, en daardoor rcAAV zou kunnen ontstaan.

De kans dat er homologe recombinatie optreedt tussen de op het 'packaging' plasmide aanwezige AAV sequenties in de BDD hFVIII expressie cassette enerzijds (AAV-2 ITR's), en de *rep/cap* expressiecassette anderzijds (AAV p5 promotor, AAV-2 *rep* en AAV-hu37 *cap*) waardoor er rcAAV zou kunnen ontstaan, acht de aanvrager eveneens hoogst onwaarschijnlijk. In zoogdiercellen is voor homologe recombinatie minimaal een overlap van 200 bp nodig,<sup>49</sup> en de aanvrager geeft aan dat de AAV-2 ITR's kleiner dan 200 bp zijn.

In het theoretische geval dat er door recombinatie een hybride genoom ontstaat bestaande uit de BDD hFVIII en *rep/cap* expressiecassettes, acht de aanvrager de kans verwaarloosbaar klein dat dit in een virusdeeltje ingepakt wordt omdat een AAV-capsid maximaal ca. 5 kb kan bevatten.<sup>50</sup> Een op deze wijze ontstaan hybride genoom zou de limiet van 5 kb ruimschoots overtreffen.

De COGEM merkt op dat de aanvrager de DTX201 vectorbatch niet analyseert op de aanwezigheid van 'rcAAV'. In het onwaarschijnlijke geval dat er in de vectorbatch 'rcAAV' ontstaat, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein, omdat het virus vergelijkbaar is met wildtype AAV zonder dat er een transgen aanwezig is, en vanwege het feit dat het virus voor zijn replicatie en verspreiding ook nog afhankelijk is van een helpervirus.

---

<sup>1</sup> De term 'replicatiecompetent' AAV wordt gebruikt om aan te geven dat de vector vergelijkbaar is met wildtype AAV. Hierbij moet vermeld worden dat AAV replicatiedeficiënt is en daarom niet kan repliceren in afwezigheid van helpervirussen.

#### *4.4.2 Aanwezigheid van niet-vector gerelateerde sequenties in het vectordeeltje*

Tijdens de productie van de DTX201 vectorbatch kunnen lage hoeveelheden plasmide of gastheercel DNA-sequenties ingebouwd worden in het eindproduct. De aanvrager geeft aan dat het een bekend fenomeen is dat bij de productie van gg-AAV vectoren een lage hoeveelheid niet-vector gerelateerde sequenties in de capsid-eiwitten ingepakt worden. Bij HeLa productiecellijnen is dit minder dan 0,1% van het vector DNA.<sup>51,52,53</sup> De aanwezigheid van deze heterologe sequenties in de vectorbatch leidt niet tot risico's voor mens en milieu, omdat deze sequenties geen selectief voordeel opleveren en zich niet verder kunnen verspreiden.

#### *4.4.3 Recombinatie en complementatie in de patiënt*

De aanvrager heeft als exclusiecriteria opgenomen dat patiënten met verschijnselen van een actieve klinische infectie niet mogen deelnemen aan de studie. De COGEM merkt op dat, als een patiënt met klinische aanwijzingen voor een actieve virale infectie met een AAV gerelateerd helpervirus geïncubeerd wordt, zij de kans verwaarloosbaar klein acht dat er na toediening van DTX201 een drievoudige infectie van één cel kan optreden met DTX201, wildtype AAV en helpervirus. Zij acht daarom ook de kans verwaarloosbaar klein dat door recombinatie of complementatie het gg-vectorgenoom door wildtype AAV in samenwerking met helpervirus via de patiënt verder verspreid kan worden. De COGEM wijst daarnaast op het feit dat in de natuur bij AAV-infecties nooit defectieve AAV-virusdeeltjes zijn aangetroffen, wat een verdere onderbouwing levert dat de kans op verspreiding van het gg-vectorgenoom verwaarloosbaar klein is. Op basis van milieurisico-overwegingen is zij daarom van oordeel dat het niet noodzakelijk is dat patiënten met klinische verschijnselen van een actieve (helper)virus infectie van de studie worden uitgesloten.

Samengevat is de COGEM van oordeel dat de kans op recombinatie of complementatie in de patiënt en het daaraan gepaard gaande risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein is.

### **5. Conclusies en advies**

De COGEM is van oordeel dat DTX201 afdoende moleculair is gekarakteriseerd en als apathogeen aangemerkt kan worden. Na toediening van DTX201 kan de COGEM niet uitsluiten dat ten gevolge van uitscheiding derden aan de gg-vector worden blootgesteld. Zij acht de risico's voor mens en milieu ten gevolge van deze blootstelling echter verwaarloosbaar klein omdat DTX201 zich niet kan repliceren en zich daarom niet kan verspreiden. Tevens acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er in de patiënt door recombinatie of complementatie 'rcAAV' of nieuw DTX201 ontstaat. In het theoretische geval dat er toch 'rcAAV' ontstaat, acht zij - gezien het apathogene karakter van het oudervirus - de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein. Samengevat is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met DTX201 verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. Nederlandse Vereniging van Hemofilie (2016). [www.hematologienederland.nl/hemofilie](http://www.hematologienederland.nl/hemofilie) (bezocht: 12 december 2018)
2. Nederlandse Vereniging voor Hemofilie Patiënten (2016). [www.nvhp.nl/stollingsstoornissen/hemofilie.html](http://www.nvhp.nl/stollingsstoornissen/hemofilie.html) (bezocht: 12 december 2018)
3. Franchini M & Mannucci PM(2013). Hemophilia A in the third millennium. *Blood Rev.* 27: 179-184
4. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 12 december 2018)
5. Zincarelli C *et al.* (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* 16: 1073-1080
6. Tijssen P *et al.* (2012). Family *Parvoviridae*. In: Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
7. Salganik M *et al.* (2015). Adeno-associated virus as a mammalian DNA vector. *Microbiol. Spectr.* 3: doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0052-2014
8. Sonntag F *et al.* (2010). A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 10220-10225
9. Berns KI & Parrish CR (2013). Parvoviridae. In: *Fields Virology*, volume 2, 6th edition. Edited by Knipe DM en Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
10. Smith RH (2008). Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther.* 15: 817-822
11. Schnepf BC *et al.* (2005). Characterization of Adeno-associated virus genome from human tissue, *J. Virol.* 79:14793-14803
12. Flotte TR & Berns KI (2005). Adeno-associated virus: A ubiquitous commensal of mammals. *Hum. Gene Ther.* 16: 401-407
13. Hüser D *et al.* (2002). Kinetics and frequency of Adeno-associated virus site-specific integration into human chromosome 19 monitored by quantitative real-time PCR. *J. Virol.* 76: 7554-7559
14. McCarty DM *et al.* (2004). Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu. Rev. Genet.* 38: 819-845
15. Gonçalves MA (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology J.* doi:10.1186/1743-422X-2-43
16. COGEM (2018). Adeno-associated dependoparvovirus A en *Adeno-associated dependoparvovirus B* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. COGEM advies CGM/180321-01
17. Gao G *et al.* (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J. Virol.* 78: 6381-6388
18. Lind P *et al.* (1995). Novel forms of B-domain-deleted recombinant factor VIII molecules. Construction and biochemical characterization. *Eur. J. Biochem.* 232: 19-27
19. Nathwani AC *et al.* (2001). Factors influencing *in vivo* transduction by recombinant adeno-associated viral vectors expressing the human factor IX cDNA. *Blood* 97: 1258-1265
20. Nathwani AC *et al.* (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 365: 2357-2365

21. Nathwani AC *et al.* (2014). Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 371: 1994-2004
22. Thorne BA *et al.* (2009). Manufacturing recombinant Adeno-associated viral vectors from producer cell clones. *Hum. Gene Ther.* 20: 707-714
23. COGEM (2005). Gentherapie van lipoproteïne lipase (LPL) deficiënte patiënten met een adeno-associated virale vector coderend voor het LPL-eiwit (AMT-010). COGEM advies CGM/050530-01
24. COGEM (2013). Een fase 2b klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met hartfalen. COGEM advies CGM/130603-01
25. COGEM (2015). Een fase I/II klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met een ernstige tot matig ernstige hemofilie B. COGEM advies CGM/150617-01
26. COGEM (2018). Klinische studie met een gg-AAV-FIX variant ter behandeling van patiënten met matige of ernstige hemofilie B. COGEM advies CGM/180625-01
27. COGEM (2016). Klinische studie met genetisch gemodificeerd *Adeno-associated virus* ter behandeling van patiënten met reumatoïde artritis (LUMC). COGEM advies CGM/160719-02
28. COGEM (2017). Klinische studie met gg-AAV in patiënten met het Crigler-Najjar syndroom. COGEM advies CGM/170821-01
29. Pfizer Ltd. ReFacto AF 250 IU powder and solvent for solution for injection. [www.medicines.org.uk/emc/product/6558/smpc](http://www.medicines.org.uk/emc/product/6558/smpc) (bezoekt: 12 december 2018)
30. Georg LA *et al.* (2017). Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX Variant. *N. Engl. J. Med.* 377: 2215-2227
31. Rangarajan S *et al.* (2017). AAV5–Factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 377: 2519-2530
32. Mingozzi F *et al.* (2007). CD8+ T-cell responses to Adeno-associated virus capsid in humans. *Nat. Med.* 13: 419-422
33. Nathwani AC *et al.* (2007). Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates. *Blood.* 109: 1414-1421
34. Astermark J (2010). Inhibitor development: patient-determined risk factors. *Haemophilia* 16: 66-70
35. Gouw SC *et al.* (2012). F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood* 119:2922-2934
36. Wobus CE *et al.* (2000) Monoclonal antibodies against the Adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid: epitope mapping and identification of capsid domains involved in AAV-2–cell interaction and neutralization of AAV-2 infection. *J. Vir.* 74: 9281-9293
37. Natwani AC *et al.* (2011). Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins. *Mol. Ther.* 19: 876-885
38. Wang G *et al.* (2014). Assessment of toxicity and biodistribution of recombinant AAV8 vector-mediated immunomodulatory gene therapy in mice with Pompe disease. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 1:14018 doi: 10.1038/mtm.2014.18. eCollection 2014

39. Favaro P *et al.* (2009). Host and vector-dependent effects on the risk of germline transmission of AAV vectors. *Mol. Ther.* 17: 1022-1030
40. Chen SJ *et al.* (2013). Biodistribution of AAV8 vectors expressing human low-density lipoprotein receptor in a mouse model of homozygous familial hypercholesterolemia. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 24: 154-160
41. Manno CS *et al.* (2006). Successful transduction of liver in Hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* 12:342-347
42. Schuettrumpf J *et al.* (2006). Inadvertent germline transmission of AAV2 vector: findings in a rabbit model correlate with those in a human clinical trial. *Mol. Ther.* 213:1064-1073
43. Hüser D *et al.* (2017). High prevalence of infectious adeno-associated virus (AAV) in human peripheral blood mononuclear cells indicative of T Lymphocytes as sites of AAV persistence. *J. Virol.* 91. doi: 10.1128/JVI.02137-16
44. Miesbach W *et al.* (2018). Gene therapy with adeno-associated virus vector 5–human factor IX in adults with hemophilia B. *Blood* 131: 1011-1031
45. Ehrhardt A *et al.* (2003). Episomal persistence of recombinant adenoviral vector genomes during the cell cycle *in vivo*. *J. Virol.* 77: 7689-7695
46. Chen ZY *et al.* (2001). Linear DNAs concatemerize *in vivo* and result in sustained transgene expression in mouse liver. *Mol. Ther.* 3: 403-410
47. Bortolussi G *et al.* (2014). Life-long correction of hyperbilirubinemia with a neonatal liver-specific AAV-mediated gene transfer in a lethal mouse model of Crigler-Najjar Syndrome. *Hum. Gene Ther.* 25: 844-855
48. Pañeda A *et al.* (2009). Effect of adeno-associated virus serotype and genomic structure on liver transduction and biodistribution in mice of both genders. *Hum. Gene Ther.* 20: 908-917
49. Rubnitz J & Subramani S (1984). The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 4:2253-2258
50. Wu Z *et al.* (2010). Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol. Ther.* 18: 80-86
51. Hauck B *et al.* (2009). Undetectable transcription of cap in a clinical AAV vector: implications for performed capsid in immune responses. *Mol. Ther.* 17: 144-152
52. Wright JF (2014). Product-related impurities in clinical-grade recombinant AAV vectors: characterization and risk assessment. *Biomedicines.* 2: 80-97
53. Martin J *et al.* (2013). Generation and characterization of Adeno-associated virus producer cell lines for research and preclinical vector production. *Hum. Gene Ther. Methods.* 24: 252-269