

# **Inventarisatie van shedding data en analyses: mogelijkheden voor standaardisering**

Dr. Ellen A.M. Schenk-Braat

Drs. Marjolein M.K.B. van Mierlo

Dr. Leonie C.M. Kaptein

## **Projectuitvoerders**

Dit project is uitgevoerd door Drs. Marjolein van Mierlo (afdeling Urologie) onder begeleiding van Dr. Ellen Schenk-Braat (afdeling Urologie, onder supervisie van Prof. dr. C.H. Bangma) en Dr. Leonie Kaptein (afdeling Hematologie, onder supervisie van Prof. dr. G. Wagemaker) van het Erasmus MC te Rotterdam. De afdelingen Urologie en Hematologie hebben ruime ervaring in gentherapie onderzoek alsmede de uitvoering van klinische gentherapie studies. Beide afdelingen coördineren gentherapie projecten binnen het 6<sup>de</sup> Kaderprogramma van de Europese Commissie. In samenwerking met de University of York (Engeland) heeft Prof. dr. C.H. Bangma een Integrated Project genaamd GIANT (Gene therapy: an Integrated Approach for Neoplastic Treatment) geïnitieerd voor de verbetering en optimalisatie van de huidige vormen van gentherapie voor de behandeling van kanker, waarbij prostaatkanker als model wordt gebruikt. Prof. dr. G. Wagemaker coördineert een Integrated Project genaamd CONSERT (Conserted Safety and Efficiency Evaluation of Retroviral Transgenesis for Gene Therapy of Inherited Diseases). Dit project richt zich op de ontwikkeling van gentherapie voor de behandeling van monogene immuundeficiënties, erfelijke anemieën, stapelingsziekten en hemoglobine afwijkingen zoals thalassemie.

# Inhoudsopgave

## SAMENVATTING

## SUMMARY

<b>1. INLEIDING</b> .....	<b>5</b>
1.1 GENTHERAPIE .....	5
1.2 KLINISCHE GENTHERAPIE STUDIES .....	5
1.3 SHEDDING .....	5
1.4 PROJECT “STANDAARDISERING VAN CRITERIA VOOR SHEDDING ASSAYS” .....	6
<b>2. LITERATUUR OVER SHEDDING ANALYSE BIJ KLINISCHE GENTHERAPIE STUDIES</b> .....	<b>9</b>
2.1 RETROVIRALE VECTOREN .....	9
2.2 ADENOVIRALE VECTOREN .....	12
2.2.1 <i>Replicatie-deficiënte adenovirale vectoren</i> .....	12
2.2.2 <i>Conditioneel replicerende adenovirale vectoren (crads)</i> .....	17
2.3 AAV VECTOREN .....	19
2.4 ALVAC VECTOREN .....	21
2.5 KARAKTERISTIEKEN VAN IN LITERATUUR GEBRUIKTE SHEDDING ASSAYS .....	23
<b>3. SHEDDING ANALYSE IN NEDERLANDSE KLINISCHE GENTHERAPIE STUDIES</b> .....	<b>25</b>
3.1 RETROVIRALE VECTOREN .....	25
3.2 ADENOVIRALE VECTOREN .....	26
3.3 AAV VECTOREN .....	27
3.4 ALVAC VECTOREN .....	27
<b>4. SHEDDING ASSAYS IN GEBRUIK DOOR HET BEDRIJFSLEVEN</b> .....	<b>30</b>
4.1 RETROVIRALE VECTOREN .....	30
4.2 ADENOVIRALE VECTOREN .....	31
4.3 ADENO-ASSOCIATED VIRALE VECTOREN .....	33
4.4 BESCHOUWING VAN SHEDDING ANALYSE DOOR HET BEDRIJFSLEVEN .....	34
<b>5. TECHNISCHE ASPECTEN VAN SHEDDING ASSAYS</b> .....	<b>36</b>
5.1 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) .....	36
5.1.1 <i>Achtergrond van de PCR</i> .....	36
5.1.2 <i>Algemene technische aspecten van PCR</i> .....	38
5.1.3 <i>Aandachtspunten voor shedding analyse door middel van PCR</i> .....	40
5.2 BIOLOGISCHE ASSAYS .....	42
5.2.1 <i>Viruskweek</i> .....	43
5.2.2 <i>S<sup>+</sup>/L<sup>-</sup> assay</i> .....	46
5.2.3 <i>Marker rescue assay</i> .....	46
5.3 ELISA .....	47
5.3.1 <i>Achtergrond van de ELISA</i> .....	47
5.3.2 <i>ELISA voor adenovirale vectoren</i> .....	47
5.3.3 <i>ELISA voor retrovirale vectoren</i> .....	48
<b>6. RICHTLIJNEN DOOR REGELGEVENDE INSTANTIES</b> .....	<b>50</b>

6.1	OVERKOEPELENDE INSTANTIES .....	51
6.1.1	<i>European Medicines Evaluation Agency (EMA)</i> .....	51
6.1.2	<i>International Conference on Harmonisation (ICH)</i> .....	52
6.2	NATIONALE INSTANTIES .....	53
6.2.1	<i>Verenigde Staten: Food and Drug Administration (FDA) en National Institutes of Health (NIH)</i> .....	53
6.2.2	<i>China</i> .....	54
6.2.3	<i>Engeland</i> .....	55
6.2.4	<i>Zwitserland</i> .....	56
6.2.5	<i>Overige landen</i> .....	58
6.3	ALGEMENE ICH RICHTLIJNEN VOOR ASSAY VALIDATIE .....	59
<b>7.</b>	<b>KIEMCELTRANSMISSIE .....</b>	<b>63</b>
7.1	KIEMCELTRANSMISSIE IN PREKLINISCHE STUDIES .....	63
7.2	KIEMCELTRANSMISSIE IN GEPUBLICEEERDE KLINISCHE GENTHERAPIE STUDIES .....	64
7.3	KIEMCELTRANSMISSIE IN NEDERLANDSE KLINISCHE GENTHERAPIE STUDIES .....	65
7.4	RICHTLIJNEN VAN REGELGEVENDE INSTANTIES OMTRENT KIEMCELTRANSMISSIE....	65
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN .....</b>	<b>67</b>
8.1	OVERZICHT VAN DE BEVINDINGEN .....	67
8.2	CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN .....	68
8.3	LEIDRAAD VOOR HET OPZETTEN VAN EEN STRATEGIE VOOR SHEDDING ANALYSE....	69
8.4	SLOTOPMERKINGEN .....	81
<b>9.</b>	<b>BIJLAGEN .....</b>	<b>82</b>
9.1	REFERENTIELIJST .....	82
9.2	AFKORTINGENLIJST .....	88
9.3	LIJST VAN BENADERDE PERSONEN .....	90
9.4	LITERATUUR STUDIE KLINISCHE GENTHERAPIE STUDIES .....	92
9.5	KARAKTERISTIEKEN VAN IN LITERATUUR GEVONDEN SHEDDING ASSAYS .....	103
9.6	OVERZICHT GENTHERAPIE STUDIES IN NEDERLAND .....	104
9.7	SJABLON NEDERLANDSE GENTHERAPIE STUDIES .....	106

## Samenvatting

Bij genterapie kan het genterapeuticum via excreta van de behandelde proefpersoon of patiënt terecht komen in het milieu. Dit fenomeen wordt shedding genoemd. Bij een vergunningsaanvraag voor een klinische genterapie studie dient de aanvrager een milieu risicoanalyse uit te voeren wat betreft de kans op shedding en de eventuele gevolgen daarvan voor mens en milieu. Indien niet uitgesloten kan worden dat shedding optreedt en dat de effecten van shedding schadelijk kunnen zijn, wordt shedding analyse als verplichting opgelegd. Een probleem bij de advisering door de Commissie Genetische Modificatie (COGEM) is het ontbreken van gestandaardiseerde shedding testen alsmede van een goed overzicht van shedding gegevens uit afgeronde klinische studies teneinde evidence-based risicoanalyse te kunnen uitvoeren is. Daarom heeft de COGEM het project zoals beschreven in dit rapport geïnitieerd. De wijze waarop shedding analyse wordt uitgevoerd in klinische genterapie studies met retrovirale, adenovirale, adeno-associated virale en ALVAC vectoren is in kaart gebracht. Hiertoe is een literatuurstudie uitgevoerd en zijn experts uit de academische wereld, het bedrijfsleven en regelgevende instanties in binnen- en buitenland benaderd. Tevens zijn alle Nederlandse genterapiestudies in dit project betrokken. Daarnaast is een brede inventarisatie gemaakt van gepubliceerde shedding data. Op basis van de bevindingen van dit rapport kan geconcludeerd worden dat er momenteel geen uniformiteit is in shedding analyse uitgevoerd bij zowel academische als farmaceutische klinische genterapie studies, mede door het gebrek aan richtlijnen. Het advies is om de standaardisatie van shedding assays te concretiseren door middel van aanbevelingen omtrent de toe te passen methoden en algemene vereisten voor technische aspecten en het kwaliteitsniveau van deze methoden. Hiervoor wordt een uniforme leidraad voorgesteld welke de onderzoeker kan volgen voor het opzetten van een strategie voor shedding analyse. De shedding data van klinische genterapie studies verzameld in dit rapport kunnen de onderzoekers hierbij ondersteunen. De voorgestelde leidraad bevat de volgende stappen:

1. Het bepalen van de noodzaak om shedding analyse uit te voeren
2. Het bepalen in welke excreta en gedurende welke periode shedding analyse uitgevoerd dient te worden
3. Het bepalen van de methode die gebruikt dient te worden voor de shedding analyse
4. Het ontwikkelen en valideren van de shedding assay(s)

Een dergelijke leidraad moet gezien worden als een continu proces dat aangepast kan worden aan de toekomstige ontwikkelingen binnen de genterapie.

## Summary

During gene therapy, the gene therapy product can be disseminated into the environment through excreta of the treated subject or patient. This phenomenon is called shedding. For the regulatory approval procedure, the applicant is obliged to perform an environmental risk assessment with respect to the risk of shedding and eventual effects of shedding for third persons and the environment. If it cannot be excluded that shedding may occur and that effects of shedding are harmless, shedding analysis will be obligatory. The lack of standardised shedding assays and of a broad inventory of shedding data from historical clinical trials for the support of evidence-based risk assessment hinders the advisory role of the Commission on Genetic Modification (COGEM). Therefore, the COGEM has initiated the project as described in this report. The way shedding analysis is performed in clinical gene therapy studies using retroviral, adenoviral, adeno-associated viral and ALVAC vectors, has been studied. For this purpose a literature study has been undertaken and academic and commercial experts have been contacted, as well as experts from regulatory authorities, in The Netherlands and abroad. All Dutch gene therapy trials have been included in this project. In addition, an extensive inventory of published shedding data has been made. Based on the outcome of this report, it can be concluded that there is currently a lack of uniformity with respect to shedding analysis performed in academic and commercial clinical gene therapy studies. It is advised to implement the standardisation of shedding assays through recommendations on the methods to be used as well as general requirements for technical aspects and the level of quality for these methods. A uniform guidance is presented that can be used by the investigator for the design of a strategy for shedding analysis. The shedding data from clinical gene therapy trials collected in this report can offer support for this purpose. The proposed guidance is composed of the following steps:

1. Defining the need of performing shedding analysis
2. Defining the type of excreta and the period in which shedding analysis needs to be performed
3. Defining the method to be used for shedding analysis
4. Development and validation of the shedding assay(s)

Such a guidance is to be considered as a continuous process that can be adapted to future developments in gene therapy.

## Verantwoording

De (ongewenste) verspreiding van vectoren is vanaf het begin van de ontwikkeling van genterapie een aandachtspunt geweest. Wanneer vectoren in het milieu terechtkomen, wordt hiervoor steeds meer het Engelse woord ‘shedding’ gebruikt. Shedding wordt in dit rapport gedefinieerd als *het terechtkomen van het genterapeuticum in het milieu via excreta*. Voor dit project zijn urine, ontlasting, zweet, speeksel, bloed en hiervan afgeleide producten, semen en huid als excreta beschouwd. Ofschoon lichaamsvloeistoffen als bloed en semen weliswaar niet vanzelfsprekend in het milieu terechtkomen, vormen ze wel een potentiële bron van besmetting voor ziekenhuispersoneel of personen in de directe omgeving van de behandelde patiënt. Aangezien op deze wijze de kans van introductie van een vector in het milieu reëel is, is voor dit project besloten om het terechtkomen van vectoren in semen en bloed onder de definitie van shedding te laten vallen. Bij aanvragen voor klinische genterapie experimenten bij de mens wordt als voorwaarde gesteld dat de risico's die gepaard gaan met eventuele shedding voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn. Overigens is het belangrijk om op te merken dat het optreden van shedding niet per definitie een daadwerkelijk risico voor het milieu inhoudt. Een probleem bij de advisering door de Commissie Genetische Modificatie (COGEM) en de vergunningverlening is echter dat gestandaardiseerde testen om shedding vast te stellen ontbreken. In de praktijk betekent dit dat elke aanvrager eigen testen hanteert waarvan de karakteristieken niet altijd duidelijk zijn. De COGEM acht het daarom wenselijk dat shedding assays gestandaardiseerd worden en heeft met dit doel deze studie geïnitieerd. Binnen dit project is eveneens een literatuurstudie opgezet om de beperkte kennis omtrent shedding data van klinische genterapie studies uit te breiden. Mede op basis hiervan kan een reëler beeld ontstaan van het daadwerkelijk optreden van shedding alsmede het verder onderbouwen van risicoanalyses.

Bij klinische genterapie studies wordt een zeer breed scala aan zowel virale als non-virale vectoren gebruikt. Binnen het tijdsbestek van dit project is het niet haalbaar geweest om uitputtend de shedding analyses voor alle typen vectoren die klinisch getest zijn of worden te bestuderen. In 70% van alle klinische genterapie studies wordt gebruik gemaakt van virale vectoren. Omdat in het merendeel van deze studies, namelijk 85%, adenovirale, retrovirale, adeno-associated virale (AAV) en kanariepokken (ALVAC) vectoren worden toegepast, is in dit rapport prioriteit aan deze vier vectoren gegeven. Bovendien spelen potentiële

milieurisico's een grotere rol bij de toepassing van virale vectoren dan bij non-virale vectoren.

De uiteindelijke conclusies en aanbevelingen van dit rapport zijn tot stand gekomen door een inventarisatie van de shedding data en shedding assays welke bij klinische genterapie studies worden toegepast in binnen- en buitenland. Hiertoe is de literatuur geraadpleegd, heeft contact plaatsgevonden met Contract Research Organizations (CROs) en farmaceutische bedrijven, en zijn principal investigators van Nederlandse genterapie studies geïnterviewd. Daarnaast is een inventarisatie gemaakt van richtlijnen omtrent shedding welke gehanteerd worden in het buitenland. Regelgevende instanties alsmede principal investigators in het buitenland zijn hiervoor benaderd.

Dit project is begeleid door een begeleidingscommissie van de COGEM, bestaande uit de volgende leden:

- Dr. G.A.P. Hospers (voorzitter, Universitair Medisch Centrum Groningen)
- Dr. S. Ebeling (Universitair Medisch Centrum Utrecht)
- Dr. H.P.H. Hermsen (Bureau GGO, Bilthoven)
- Dr. D.A. Bleijs (secretaris, COGEM, Bilthoven)
- Dr. W.R. Gerritsen (VUmc Cancer Center Amsterdam)

Tijdens vier bijeenkomsten met de begeleidingscommissie werden aanvullingen op de onderzoeksstrategie en het rapport gegeven.



# 1. Inleiding

## 1.1 *Gentherapie*

Gentherapie kan gedefinieerd worden als het introduceren en tot expressie brengen van genetische informatie in cellen van een individu om een ziekte te genezen of de symptomen daarvan te beperken. Oorspronkelijk werd gentherapie gezien als toepassing bij monogenetische recessieve aandoeningen, maar mogelijke toepassingen zijn al heel snel uitgebreid naar meer complexe ziekten zoals cardiovasculaire aandoeningen, kanker en infectieuze ziekten. Gentherapie is een nog relatief jong onderzoeksveld. In 1953 is de DNA structuur door Crick, Watson, Wilkinson en Franklin beschreven. In 1973 is de eerste efficiënte overdracht van naakt DNA naar cellen *in vitro* gelukt en in 1980 zijn de eerste gentherapie experimenten in de mens uitgevoerd. De eerste klinische gentherapie studie is in 1989 van start gegaan en het afgelopen jaar is het eerste gentherapiemedicijn geregistreerd. Hieruit mag blijken dat het gentherapieveld volop in ontwikkeling is.

## 1.2 *Klinische gentherapie studies*

Sinds de start van klinische gentherapie zijn er inmiddels ruim 1000 studies wereldwijd gestart, waarvan op dit moment de meeste Fase I en/of II studies zijn en nog maar een paar procent Fase III studies zijn. Tweederde van alle studies betreft kankerpatiënten. In eerste instantie zijn in deze studies met name retrovirale vectoren gebruikt en een paar jaar later zijn hier adenovirale vectoren bijgekomen. Op dit moment worden deze vectoren in de helft van alle studies toegepast. Naast deze vectoren wordt in klinische gentherapiestudies ook gewerkt met het pokkenvirus, adeno-associated virus en herpes simplex virus, alsmede naakt DNA ([www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical)).

Na de eerste tien jaar van klinische gentherapiestudies is er een aantal opvallende gebeurtenissen vlak na elkaar opgetreden. In 1999 overleed de eerste patiënt na gentherapie en in 2000 werden de eerste patiënten genezen, waarbij in 2002 vervolgens ook in de eerste patiënten het risico van insertiemutagenese daadwerkelijk tot uiting is gekomen in het ontstaan van leukemie.

## 1.3 *Shedding*

Een neveneffect van gentherapie kan zijn dat het gentherapeuticum niet alleen terechtkomt in de doelcellen of doelorgaan, maar ook in andere cellen en organen van het behandelde

individu. Een algemene term voor verspreiding binnen het organisme is “biodistributie”. Indien een gentherapeuticum zich verspreid naar excreta, kan het via deze weg terechtkomen in het milieu. Dit laatste wordt ook wel shedding genoemd. Shedding is een belangrijk aspect bij de beoordeling van een (pre)klinische gentherapie studie op potentiële milieurisico’s. De onderzoeker hoeft niet uit te sluiten dat shedding optreedt, maar dient door middel van een risicoanalyse de kans op en de effecten van eventuele shedding voor mens en milieu te evalueren. Indien de onderzoeker op basis van historische gegevens of door middel van theoretische onderbouwing kan aantonen dat de te verwachten (negatieve) effecten nihil zijn, wordt het milieurisico als minimaal beschouwd en is shedding analyse geen verplichting. Als het milieurisico van shedding niet verwaarloosbaar klein is, dient de onderzoeker shedding analyse tijdens de klinische studie uit te voeren en passende veiligheidsmaatregelen te treffen.

Om meer kennis te verkrijgen over shedding en de mogelijkheid te creëren om te discussiëren over dit onderwerp heeft de COGEM in samenwerking met de Nederlandse Vereniging voor Gentherapie (NVGT) op 22 januari 2004 een workshop georganiseerd (Bleijs 2005). Tijdens deze workshop werden door gentherapie onderzoekers uit binnen- en buitenland gegevens uit eigen onderzoek en de literatuur gepresenteerd over shedding van adenovirale, retrovirale, AAV en ALVAC vectoren. Met name voor adenovirale vectoren en AAV bleek vector shedding in een aantal studies waargenomen te zijn. Voor verdere details wordt verwezen naar het verslag van deze workshop (Bleijs 2005). Een belangrijke conclusie van de workshop was dat er tot op heden slechts beperkte data over vector shedding beschikbaar zijn. Vergroting van de kennis over shedding is van belang om te komen tot evidence-based risicoanalyse (Bleijs 2005).

#### ***1.4 Project “Standaardisering van criteria voor shedding assays”***

Voor de milieurisicoanalyse en de te bepalen strategie voor shedding analyse zijn historische shedding gegevens van groot belang. Bij de beoordeling van een klinische gentherapie studie vormt het ontbreken van gestandaardiseerde testen voor shedding analyse een probleem bij het inschatten van milieurisico’s door het mogelijk optreden van shedding. Het resultaat is dat elke aanvrager zelf besluit met behulp van welke assay shedding wordt gemeten en vaak zelf ontwikkelde assays toepast. Dit maakt het lastig om uniformiteit tussen studies te bereiken, waardoor het niet goed mogelijk is om studies onderling te vergelijken en op basis daarvan conclusies te trekken voor toekomstige ontwikkelingen en verbeteringen. Het primaire doel van dit project is om een rapport op te stellen dat aan de COGEM handvaten biedt voor de toekomstige standaardisatie van criteria voor shedding assays. Deze standaardisatie zal de

risicoanalyse bij klinische genterapie studies ten goede komen. Een secundair doel is om in dit project een beter inzicht in shedding data van klinische genterapie studies te verkrijgen teneinde evidence-based risicoanalyse te ondersteunen.

De term shedding wordt binnen het vakgebied genterapie nog relatief weinig toegepast. Om die reden is voor dit rapport de volgende definitie van shedding gehanteerd: *het terechtkomen van het genterapeuticum in het milieu via excreta*. Onder excreta vallen voor dit project de volgende biomaterialen: urine, ontlasting, zweet, speeksel, semen, bloed en hiervan afgeleide producten, en huid (indien relevant). Twee bijzondere vormen van introductie in het milieu betreffen de excretie van replicatie-competent virus bij toepassing van een replicatie-deficiënte vector en kiemceltransmissie. Deze zullen ook behandeld worden in dit rapport. Bij de toepassing van een replicatie-deficiënte virale vector kan theoretisch replicatie-competent virus ontstaan door recombinatie van de vector met wildtype virus aanwezig in het behandelde individu of in het productiesysteem. Verspreiding van een dergelijk product in de omgeving kan een risico vormen voor mens en milieu met daarbij optredende ongewenste effecten. Door kiemceltransmissie kan de virale vector terechtkomen in een nakomeling van het behandelde individu, wat niet alleen een speciale introductie in het milieu is, maar met name ook een ethisch ongewenst en onacceptabel effect van shedding is.

Voor de uitvoering van dit project is de volgende onderzoeksstrategie gevolgd:

- Een literatuuronderzoek is uitgevoerd naar de toepassing van shedding analyse en resultaten daarvan bij klinische genterapie studies (hoofdstuk 2). Op deze manier is een inventarisatie van shedding data gemaakt en is een overzicht verkregen van shedding assays die worden gebruikt bij voornamelijk investigator-initiated klinische genterapie studies.
- De shedding analyse en shedding data van klinische genterapie studies in Nederland zijn geïnventariseerd. Hiervoor zijn interviews gehouden met de principal investigators van deze studies en gegevens verzameld uit het dossier van Bureau Genetisch Gemodificeerde Organismen (Bureau GGO) (hoofdstuk 3).
- De shedding assays die gebruikt worden in klinische genterapie studies geleid door farmaceutische bedrijven, al dan niet ontwikkeld en uitgevoerd door Contract Research Organizations, zijn in kaart gebracht (hoofdstuk 4). Bij dit soort studies met als doel een genterapeuticum uiteindelijk te registreren is de rol van regelgevende instanties als de

FDA en EMEA meer prominent dan bij investigator-initiated studies. De analyse van shedding wordt daardoor vanuit een ander perspectief benaderd.

- Op basis van de bevindingen van hoofdstukken 2, 3 en 4 zijn de technische aspecten van de methoden die het meest toegepast worden voor shedding analyse nader bestudeerd (hoofdstuk 5)
- Er is een inventarisatie gemaakt van de richtlijnen, adviezen en standpunten over shedding door regelgevende instanties. Naast de FDA en EMEA zijn hiervoor ook diverse experts benaderd, zoals de ICH Gene Therapy Discussion Group, de EMEA Gene Therapy Working Party en buitenlandse onderzoekers (hoofdstuk 6).
- Uit de verzamelde informatie zijn gegevens over kiemceltransmissie samengevat in hoofdstuk 7.

In hoofdstuk 8 wordt een analyse gemaakt van alle verzamelde gegevens en worden aanbevelingen gedaan voor toekomstige standaardisatie van shedding assays.

## 2. Literatuur over shedding analyse bij klinische gentherapie studies

Dit hoofdstuk beschrijft hoe shedding analyse wordt uitgevoerd bij klinische gentherapie studies met virale vectoren. Hiervoor is een literatuuronderzoek uitgevoerd met behulp van PubMed, waarbij een limiet is ingesteld op “clinical trial” en als zoektermen de virusnamen (retrovirus, adenovirus, AAV en ALVAC) met of zonder “vector” en wel of niet in combinatie met de zoektermen “shedding” of “gene therapy” zijn gehanteerd. Door middel van een steekproef, gebruik makend van de Amerikaanse database van humane genoverdracht studies ([www.gemcris.od.nih.gov](http://www.gemcris.od.nih.gov)), is vastgesteld dat met bovenstaande zoektermen gemiddeld 90% van de publicaties over klinische gentherapie studies met deze specifieke virale vectoren wordt gevonden. Voor de voor dit rapport relevante publicaties is vervolgens een aantal parameters bekeken, waaronder het type shedding assay, assay karakteristieken, geteste monsters, tijdstip van shedding analyse en shedding data. De uitwerking hiervan is opgenomen in bijlage 9.4. Er dient opgemerkt te worden dat in een aantal gevallen meerdere publicaties over dezelfde studie zijn gevonden, waardoor het aantal publicaties niet overeenkomt met het aantal uitgevoerde studies. Hieronder worden achtereenvolgens de resultaten van het literatuuronderzoek voor retrovirale, adenovirale, AAV en ALVAC vectoren beschreven.

### 2.1 *Retrovirale vectoren*

<b>Totaal gevonden publicaties</b>	<b>98</b>
- Protocol publicatie	27 (28%)
- Publicaties zonder shedding analyse	45 (46%)
- Publicaties met shedding analyse	26 (27%)

Van de 26 publicaties over studies met een retrovirale vector waarin melding wordt gemaakt van shedding analyse zijn uiteindelijk in dit rapport 24 publicaties gebruikt voor de analyses en de conclusies. Twee publicaties (Simons, Jaffee et al. 1997; Kohn, Bauer et al. 1999) waarin wordt gesteld dat shedding van replicatie-competent retrovirus niet werd waargenomen zonder vermelding van het type shedding assay, zijn buiten beschouwing gelaten. Vijftien publicaties beschreven een *in vivo* gentherapie studie, waarbij de retrovirale vector direct of in de vorm van vector-producerende cellen aan de patiënt werd toegediend. In elf gevallen betrof het een *ex vivo* gentherapie studie, waarbij patiënten behandeld werden met autologe cellen die *ex vivo* zijn getransduceerd met de retrovirale vector.

Shedding van replicatie-competent retrovirus (RCR) werd geanalyseerd in 13 publicaties. In vijf publicaties werd gekeken naar shedding van de retrovirale vector zelf en in zes studies werden beide vormen van shedding geanalyseerd. In Tabel 2.1 worden de belangrijkste bevindingen samengevat.

**Tabel 2.1 Shedding gegevens in publicaties van klinische gentherapie studies met een retrovirale vector.**

	<b>Aantal publicaties (24 in totaal)</b>
Aantal gebruikte shedding assays	
- 1 type assay	22 (92%)*
- 2 typen assays	2 (8%)
Type shedding assay	
- PCR	21 (88%)
▪ <i>qPCR</i>	2 (9%)
▪ <i>non-qPCR</i>	14 (67%)
▪ <i>niet vermeld</i>	5 (24%)
- marker rescue assay	3 (13%)
- sarcoma-positive/leukemia-negative (S <sup>+</sup> /L <sup>-</sup> ) assay	2 (8%)
<b>Parameters</b>	<b>Bevindingen</b>
Beschreven assay karakteristieken	detectiegrens, specificiteit
Geanalyseerde monsters	bloed of aanverwante producten, urine, sputum, huid, semen, gonadaal weefsel
Tijdstippen shedding analyse	detectie van viraal DNA in 1 <sup>e</sup> maand na toediening, detectie van RCR tot 12 maanden na toediening
Shedding data	op geen enkel tijdstip RCR in bloedmonsters aangetoond, viraal DNA aangetoond in 1 <sup>e</sup> 24 uur tot maximaal 28 dagen na toediening.

\* Percentages (uitgezonderd schuin weergegeven) zijn gebaseerd op het aantal geanalyseerde publicaties. Voor de PCR is het aantal publicaties waarin een kwantitatieve PCR (qPCR), een niet-kwantitatieve PCR (non-qPCR) of een niet nader gedefinieerde PCR (niet vermeld) is gebruikt, schuin weergegeven. De hierbij vermelde percentages zijn gebaseerd op het aantal publicaties waarbij een PCR is toegepast.

De volgende conclusies kunnen getrokken worden uit de gevonden gegevens:

### **(1) Type shedding assay**

- Voor de analyse van retrovirale vector shedding werd in alle publicaties gebruik gemaakt van een vector-specifieke Polymerase Chain Reaction (PCR). Deze methode werd in de meeste gevallen ook toegepast voor het detecteren van RCR shedding (19 publicaties) waarbij primers werden gebruikt die specifiek zijn voor RCR sequenties, zoals de sequentie voor het virale envelop-eiwit. In het merendeel van de publicaties werd een

niet-kwantitatieve PCR gebruikt. Biologische assays zoals de marker rescue assay (3 publicaties) en de sarcoma-positive/leukemia-negative ( $S^+/L^-$ ) assay (2 publicaties) bleken minder frequent toegepast te worden voor RCR analyse.

## **(2) Karakteristieken van shedding assays**

- In negen publicaties werd informatie over de gevoeligheid van de PCR verstrekt en in één publicatie over de gevoeligheid van een marker rescue assay (bijlage 9.4). Daarnaast werd in alle gevallen de specificiteit van de PCR vermeld.

## **(3) Monsters**

- Detectie van RCR werd in alle gevallen uitgevoerd op bloed of aanverwante producten. Ook voor de detectie op shedding van vector DNA werd in alle gevallen getest op bloed of aanverwante producten. Daarnaast werden in drie studies andere monsters geanalyseerd. Bij intratumorale toediening in kleincellig longcarcinoom werd sputum geanalyseerd (Roth, Nguyen et al. 1996). Naast bloed werd urine geanalyseerd in een studie waarbij retrovirus intratumoraal werd toegediend in hersentumoren (Sandmair, Loimas et al. 2000). Huid werd geanalyseerd nadat intratumoraal retrovirus werd toegediend bij borstkanker en melanomen (Braybrooke, Slade et al. 2005). In één studie is semen getest (Powell, Ragni et al. 2003) en in twee studies gonadaal weefsel dat na obductie werd verkregen (Shand, Weber et al. 1999; Rainov 2000).

## **(4) Tijdstip shedding analyse**

- De afname tijdstippen van shedding monsters verschillen sterk en zijn onderling niet vergelijkbaar. Over het algemeen kan gesteld worden dat analyses voor de detectie van viraal DNA uitgevoerd werden in de eerste maand na toediening van de vector, terwijl detectie van RCR met intervallen van 3 maanden werd uitgevoerd tot gemiddeld 1 jaar na toediening van de vector.

## **(5) Shedding data**

- In de *ex vivo* studies werden monsters alleen geanalyseerd op het voorkomen van RCR. Een logische verklaring hiervoor is dat door deze *ex vivo* gentherapie de retrovirale vector niet direct maar verpakt in cellen wordt ingespoten in de patiënt. Een vereiste hierbij is dat de *ex vivo* getransduceerde cellen vrij dienen te zijn van nog vrij voorkomende vectordeeltjes en/of RCR. Indien het materiaal aan deze eis voldoet, kan de retrovirale vector alleen voorkomen in (nakomelingen) van getransplanteerde cellen en niet terechtkomen in de overige cellen van de patiënt. Shedding van RCR werd in de publicaties op geen enkel tijdstip gedetecteerd.

- In de *in vivo* studies werd naast analyse op vector DNA ook gekeken naar het voorkomen van RCR. In geen van deze studies werd RCR gedetecteerd. Dit komt overeen met de conclusies uit een review van Long (Long, Li et al. 1998), waarin data geanalyseerd zijn van 128 patiënten met hersentumoren die vector producerende cellen intratumoraal toegediend kregen. Uit deze analyse bleek dat in geen van de 608 bloedmonsters RCR gedetecteerd werd met een PCR assay.
- In drie publicaties waarbij de vector *in vivo* intratumoraal werd toegediend bij borstkanker, melanoma en glioblastoma werd in de eerste 24 uur na toediening vector DNA gedetecteerd in een aantal monsters van perifeer bloed mononucleaire cellen (PBMC). Alle monsters die na 24 uur werden afgenomen waren negatief (Klatzmann, Cherin et al. 1998; Klatzmann, Valery et al. 1998; Braybrooke, Slade et al. 2005). In een tweetal publicaties waarbij de vector intraperitoneaal werd toegediend bij ovariumcarcinoom werd ook viraal DNA gedetecteerd in PBMC in de eerste 24 uur (Tait, Obermiller et al. 1997; Tait, Obermiller et al. 1999). In drie publicaties werd viraal DNA gedetecteerd in PBMC tot 28 dagen na intratumorale toediening van de vector in hersentumoren (Shand, Weber et al. 1999; Packer, Raffel et al. 2000; Rainov 2000). Na 28 dagen werd in geen enkele publicatie viraal DNA gedetecteerd.
- Er zijn geen aanwijzingen gevonden voor shedding naar semen (één studie) en gonadaal weefsel (twee studies). Voor meer informatie wordt verwezen naar hoofdstuk 7 “Kiemceltransmissie”.

## 2.2 *Adenovirale vectoren*

<b>Totaal gevonden publicaties</b>	<b>141</b>
- Protocol publicatie	17 (12%)
- Publicaties zonder shedding analyse	63 (45%)
- Publicaties met shedding analyse	61 (43%)
▪ <i>replicatie-deficiënt adenovirale vector</i>	45 (74%)
▪ <i>conditioneel replicerend adenovirale vector</i>	16 (26%)

In 43% van de publicaties is op enigerlei wijze melding gemaakt van shedding analyse. Deze artikelen zijn vervolgens onderverdeeld naar het type gebruikte adenovirale vector, namelijk replicatie-deficiënt (Tabel 2.2) en conditioneel replicerend adenovirus (crad) (Tabel 2.3).

### 2.2.1 **Replicatie-deficiënte adenovirale vectoren**

Van de 45 publicaties over een replicatie-deficiënte adenovirale vector (Tabel 2.2) zijn uiteindelijk in dit rapport 43 publicaties gebruikt voor de analyses en de conclusies. Twee



publicaties (Crystal, McElvaney et al. 1994; Rosengart, Lee et al. 1999) waarin wordt gesteld dat shedding niet werd waargenomen zonder vermelding van het type shedding assay zijn buiten beschouwing gelaten.

**Tabel 2.2 Shedding gegevens in publicaties van klinische genterapie studies met een replicatie-deficiënte adenovirale vector.**

	Aantal publicaties (43 in totaal)
Aantal gebruikte shedding assays	
- 1 type assay	23 (53%)*
- 2 typen assays	18 (42%)
- > 2 typen assays	2 (5%)
Type shedding assay	
- PCR	28 (65%)
▪ <i>qPCR</i>	5 (18%)
▪ <i>non-qPCR</i>	13 (46%)
▪ <i>niet vermeld</i>	10 (36%)
- viruskweek	30 (70%)
- ELISA	8 (19%)
Parameters	Bevindingen
Beschreven assay karakteristieken	detectiegrens, kwantificeringsgrens, specificiteit
Geanalyseerde monsters	bloed of aanverwante producten, neusuitstrijkje, keeluitstrijkje, sputum/broncho-alveolaire lavage (BAL), huid, urine, ontlasting, semen
Tijdstippen shedding analyse	voor toediening virale vector, direct of binnen 24 uur na toediening, 1 <sup>e</sup> 7 dagen dagelijks, daarna intervallen van 1 week of meer tot maximaal 1 jaar na toediening
Shedding data	Viruskweek: - als uitslag positief dan in meeste gevallen binnen 24 uur na toediening PCR: - als uitslag positief dan in meeste gevallen binnen 48 uur na toediening

\* Percentages (uitgezonderd schuin weergegeven) zijn gebaseerd op het aantal geanalyseerde publicaties. Voor de PCR is het aantal publicaties waarin een kwantitatieve PCR (qPCR), een niet-kwantitatieve PCR (non-qPCR) of een niet nader gedefinieerde PCR (niet vermeld) is gebruikt, schuin weergegeven. De hierbij vermelde percentages zijn gebaseerd op het aantal publicaties waarbij een PCR is toegepast.

De volgende conclusies kunnen getrokken worden uit de gevonden gegevens:

### (1) Type shedding assay

- In ongeveer de helft van de publicaties werd gebruik gemaakt van één type shedding assay en in de overige publicaties van twee of meer typen assays.

- Een biologische assay (viruskweek) en PCR werden het meest toegepast voor shedding analyse. In een beperkt aantal publicaties (19%) werd hiervoor een Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) gebruikt. Bij meer dan de helft van het aantal publicaties waarbij PCR als shedding assay werd toegepast, werd het type PCR vermeld waarbij in het merendeel van de gevallen sprake was van een niet-kwantitatieve PCR.

## **(2) Karakteristieken van shedding assays**

- In ongeveer eenderde van de publicaties werd informatie verstrekt over de gevoeligheid van de shedding assay (bijlage 9.4). In meer dan 65% van de publicaties werd informatie verstrekt over de specificiteit van de PCR. De PCR was op één uitzondering na in alle gevallen specifiek voor de vector.

## **(3) Monsters**

- Bloed of aanverwante producten zoals plasma en serum werden in vrijwel alle studies op shedding getest. Daarnaast blijkt de keuze van monsters ook gekoppeld te zijn aan de wijze van toediening van de vector. Bijvoorbeeld bij intradermale toediening van de vector (Harvey, Worgall et al. 1999) werd shedding analyse verricht in de monsters van de huid bij de injectieplaats. In één studie werd semen geanalyseerd (Grines, Watkins et al. 2002).

## **(4) Tijdstip shedding analyse**

- Het tijdstip van afname van monsters verschilt enorm per protocol en is hierdoor moeilijk vergelijkbaar. Algemeen kan gesteld worden dat monsters worden afgenomen voor toediening, in de eerste 24 uur na toediening en in de eerste maand na toediening. In de monsters afgenomen voor toediening van de vector zal uiteraard geen sprake zijn van shedding. Naast het feit dat deze afname een standaard negatieve controle monster oplevert, kunnen gegevens verzameld op een dergelijk tijdstip tevens gebruikt worden om een basiswaarde vast te stellen waarmee testresultaten na vector toediening vergeleken kunnen worden. Een toename zou daarbij kunnen duiden op shedding. Op deze wijze kan met een shedding assay die niet vector-specifiek is, zoals de ELISA, toch een uitspraak gedaan worden over verspreiding van de vector via excreta (zie hoofdstuk 5, paragraaf 5.3.2). In drie studies werden monsters gedurende een langere periode geanalyseerd, namelijk tot 3 maanden (Griscelli, Opolon et al. 2003), 6 maanden (Germano, Fable et al. 2003) en 12 maanden na toediening (Grines, Watkins et al. 2002). Door de onderzoekers wordt geen verklaring gegeven voor de gekozen tijdstippen van shedding analyse. In de studies van Germano en Grines lijkt het tijdschema verband te houden met de tijdstippen waarop de patiënt ook andere vervolgonderzoeken ondergaat.

## (5) Shedding data

- In 62% van de publicaties is op enig moment infectieus virus (bepaald met viruskweek; 20%) of viraal DNA (bepaald met PCR; 42%) gedetecteerd. Hierbij dient opgemerkt te worden dat in een aantal gevallen het waarnemen van shedding verwacht kan worden gezien de toedieningsplaats, tijdstip van shedding analyse en het type monster. In de studie van Grines (Grines, Watkins et al. 2002) werd bijvoorbeeld 1 uur na intracoronaire toediening shedding analyse verricht in het bloed, waarbij alle monsters positief bleken. Dit kan in feite beschouwd worden als een meting van biodistributie. Shedding analyse verricht op latere momenten laten geen infectieus virus zien, wat duidt op klaring of neutralisatie van virus in de circulatie. Andere voorbeelden betreffen het toedienen van vector in de longen (Tursz, Cesne et al. 1996; Nemunaitis, Swisher et al. 2000) of intranasaal (Zabner, Ramsey et al. 1996) waarna binnen 24 uur infectieus virus werd gedetecteerd in monsters uit de luchtwegen.
- De geanalyseerde publicaties en studies lopen sterk uiteen, waardoor het moeilijk is om algemene uitspraken te doen. Heel globaal kan gesteld worden dat shedding van infectieus adenovirus optreedt bij een toegediende dosis van  $10^{10}$  particle forming units (pfu) of hoger. Twee studies vormen hierop een uitzondering. In een studie waarbij de vector intratumoraal in de tractus digestivus werd toegediend in een dosis van  $10^7$ - $10^9$  pfu werd 15 minuten na toediening van de vector infectieus virus gedetecteerd in bloed. Op latere tijdstippen werd geen shedding waargenomen (Gilly, Beaujard et al. 1999). In een andere studie waarbij shedding werd waargenomen bij een toegediende dosis van  $10^7$ - $10^8$  pfu, werd de vector intratumoraal toegediend in de long voor de behandeling van longkanker. Alle broncho-alveolaire lavages die afgenomen werden direct na toediening van de vector waren positief voor infectieus virus (Tursz, Cesne et al. 1996). Zo kort na toediening van de vector kan verwacht worden dat in monsters afgenomen uit de directe omgeving van de plaats van toediening verspreiding van het virus vastgesteld kan worden. Bij intrapleurale toediening van de vector in een hogere dosis ( $1 \times 10^9$ - $1 \times 10^{12}$  pfu) werd in monsters van neus, keel, urine en ontlasting geen infectieus virus gedetecteerd (Serman, Treat et al. 1998; Serman, Molnar-Kimber et al. 2000). Deze bevinding lijkt te suggereren dat verspreiding van de vector uit de pleurale ruimte naar de rest van het lichaam niet of nauwelijks plaatsvindt.
- In twee studies is shedding bekeken in semen, waarbij in één studie het enige semen monster dat geanalyseerd werd positief bleek te zijn voor vector DNA (Herman, Adler et al. 1999). Voor meer informatie wordt verwezen naar hoofdstuk 7 “Kiemceltransmissie”.

Bij gebruik van replicatie-deficiënte adenovirale vectoren blijft de mogelijkheid bestaan tot vorming van replicatie-competent adenovirus (RCA). Een replicatie-deficiënt adenovirus kan de benodigde replicatie sequenties bijvoorbeeld verkrijgen door recombinatie met wild-type adenovirus dat latent aanwezig is in de patiënt. In 6 publicaties (Crystal, McElvaney et al. 1994; Harvey, Leopold et al. 1999; Stewart, Lassam et al. 1999; Nemunaitis, Swisher et al. 2000; Griscelli, Opolon et al. 2003; Lang, Bruner et al. 2003) zijn patiëntenmonsters ook getest op het voorkomen van RCA met behulp van een viruskweek. Deze studies zijn in bijlage 9.4 schuin weergegeven. Voor RCA analyse werd gebruik gemaakt van een viruskweek met cellen waarin een replicatie-deficiënte adenovirale vector niet kan repliceren, zoals bijvoorbeeld de A549 of de Hep2 cellijn. Bij twee studies is hiernaast ook een PCR assay die specifiek E1 sequenties detecteert toegepast (Stewart, Lassam et al. 1999; Griscelli, Opolon et al. 2003). Bij geen van de studies werd RCA gedetecteerd. Een opvallende bevinding bij de studie van Griscelli is dat van één patiënt de bloedmonsters vóór en na toediening (tot dag 4) van de vector positief bleken voor E1-sequenties met een kwantitatieve PCR (sensitiviteit 2,5-25 kopieën van E1 adenovirus sequenties). Een viruskweek uitgevoerd met Hep2 cellen op dezelfde monsters toonde geen infectieus virus aan, waarna de onderzoekers concludeerden dat de gevonden E1-sequenties afkomstig zijn van latent aanwezig adenovirus. Uit de literatuur blijkt dat adenovirus latent kan voorkomen in lymfeklieren (Abken, Butzler et al. 1987) en vastgesteld is dat adenovirus gedetecteerd kan worden tot 24 maanden na de initiële infectie (Fox, Brandt et al. 1969).

In vier studies met een replicatie-deficiënt adenovirus zijn naast shedding analyse van patiëntenmateriaal ook monsters van personeel geanalyseerd met behulp van viruskweek en PCR (Tursz, Cesne et al. 1996; Clayman, el-Naggar et al. 1998; Gilly, Beaujard et al. 1999; Griscelli, Opolon et al. 2003). Bloed, urine, keeluitstrijkjes en/of ontlasting werd verzameld van verplegend personeel, behandelend artsen en anaesthesiologen (indien in aanraking geweest met patiënt). In de studie van Clayman werden de monsters ongeveer 10 dagen na toediening van de vector aan de patiënt afgenomen en in de studie van Tursz na 8 dagen. Bij de andere studies wordt geen tijdstip vermeld. Alle monsters waren negatief voor wild-type of recombinant adenovirus. Het risico van verspreiding van de vector naar derden in de omgeving van de patiënt lijkt op basis van deze resultaten zeer klein te zijn.

## 2.2.2 Conditioneel replicerende adenovirale vectoren (crads)

Twaalf van de 16 gevonden publicaties beschrijven studies met de bekende crad ONYX-15. ONYX-015 is een mutant adenovirus met een deletie van het E1B domein. Dit virus kan daarom alleen repliceren in cellen met een gestoord *p53* mechanisme. In Tabel 2.3 worden de belangrijkste bevindingen samengevat.

**Tabel 2.3 Shedding gegevens in publicaties van klinische genterapie studies met een crad.**

	Aantal publicaties (16 in totaal)
Aantal gebruikte shedding assays	
- 1 type assay	11
- 2 typen assays	5
Type shedding assay	
- PCR	16
▪ <i>qPCR</i>	10
▪ <i>non-qPCR</i>	5
▪ <i>niet vermeld</i>	1
- viruskweek	5
Parameters	Bevindingen
Beschreven assay karakteristieken (7 publicaties)	detectiegrens, kwantificeringsgrens, specificiteit
Geanalyseerde monsters	bloed of aanverwante producten, urine, huid, ascites, gal
Tijdstippen shedding analyse	0 tot maximaal 2 jaar
Shedding data	PCR: - viraal DNA gedetecteerd in bloed in 1 <sup>e</sup> 24 uur tot 11 weken na toediening viruskweek: - in aantal studies infectieus virus gevonden tot één week na toediening

Voor de PCR is het aantal publicaties waarin een kwantitatieve PCR (qPCR), een niet-kwantitatieve PCR (non-qPCR) of een niet nader gedefinieerde PCR (niet vermeld) is gebruikt, schuin weergegeven.

De volgende conclusies kunnen getrokken worden uit de gevonden gegevens:

### (1) Type shedding assay

- In het merendeel van de publicaties is gebruik gemaakt van een qPCR voor shedding analyse.

### (2) Karakteristieken van shedding assays

- In het merendeel van de publicaties werd informatie verstrekt over de gevoeligheid van de shedding assay (bijlage 9.4). De PCR was in alle gevallen specifiek voor de vector.

- In 64% van de publicaties worden karakteristieken vermeld van de assays, welke in alle gevallen de gevoeligheid van de assay betrof.

### **(3) Monsters**

- In alle publicaties werden bloed of aanverwante producten als monster voor shedding analyse gebruikt. In een studie waarbij de crad intratumoraal werd toegediend bij hoofd/hals kanker werd naast bloed ook huid geanalyseerd (Ganly, Kirn et al. 2000). Bij intratumorale of intraperitoneale toediening in hepatobilliaire carcinomen werd geen bloed geanalyseerd maar urine, ascites en gal (Makower, Rozenblit et al. 2003). Ascites en gal zijn hoogstwaarschijnlijk gekozen omdat deze monsters afkomstig zijn uit het gebied van toediening. In twee studies waarbij de vector intratumoraal in de prostaat werd toegediend werd naast bloed ook urine geanalyseerd (DeWeese, van der Poel et al. 2001; Freytag, Khil et al. 2002)

### **(4) Tijdstip shedding analyse**

- Shedding analyse werd over het algemeen uitgevoerd van 0 tot maximaal 15 dagen na toediening van de vector. In twee studies wordt een langere follow-up tijd vermeld van 3 maandelijkse analyses tot maximaal 2 jaar (Freytag, Khil et al. 2002; Freytag, Stricker et al. 2003)

### **(5) Shedding data**

- In 14 van de 16 publicaties werd op enig moment viraal DNA gedetecteerd. Detectie van viraal DNA in bloed vond meestal plaats binnen 24 uur na toediening van de vector. Opmerkelijk hierbij is dat in het merendeel van de studies de vector intratumoraal werd toegediend. In twee studies waarbij de vector intratumoraal werd toegediend in de prostaat werd viraal DNA gedetecteerd in bloed tot 45 en 76 dagen na toediening (Freytag, Khil et al. 2002; Freytag, Stricker et al. 2003). Hierbij dient als kanttekening te worden geplaatst dat voor de shedding analyse gebruik is gemaakt van een kwantitatieve PCR met een zeer hoge gevoeligheid (2 VP/ml, dit in tegenstelling tot een gevoeligheid van 500 VP/ml of hoger in andere studies). In drie studies is met behulp van een viruskweek gekeken naar infectieus virus in urine (DeWeese, van der Poel et al. 2001; Freytag, Khil et al. 2002; Makower, Rozenblit et al. 2003). Alleen in de studie van De Weese werd infectieus virus gedetecteerd in urine na i.t. toediening van de vector in de prostaat. Virus werd gedetecteerd na 2 dagen tot maximaal 14 dagen. Huidmonsters geanalyseerd met een viruskweek lieten na i.t. toediening bij hoofd/hals tumoren geen infectieus virus zien (Ganly, Kirn et al. 2000). In de studie van Habib (Habib, Salama et al. 2002) werd 30 minuten na intraveneuze vector toediening shedding van viraal DNA in

bloedmonsters waargenomen. Na 4 uur was dit niet meer detecteerbaar en bleek het viraal DNA uit het bloed geklaard of geneutraliseerd.

- In de studie van Galanis (Galanis, Okuno et al. 2005) werd op dag 5 viraal DNA in bloed gedetecteerd. De hoeveelheid viraal DNA nam vervolgens op dag 10 af, waarna op dag 12 een toename gezien werd in viraal DNA. Dit duidt volgens de onderzoekers op de verwachte conditionele replicatie van ONYX-015 in sarcomen *in vivo*. Eenzelfde fenomeen werd gezien in de studie van de Weese (DeWeese, van der Poel et al. 2001). Hierbij werd 30 minuten na toediening van een prostaat-specifieke crad in de prostaat viraal DNA gedetecteerd in het bloed van 14 van de 16 patiënten. Dit nam af tot onmeetbaar in de 12 tot 24 uur daaropvolgend. Gemiddeld drie dagen na toediening van de vector werd opnieuw viraal DNA aangetoond bij 13 van de 16 patiënten. In 10 patiënten bleek de hoeveelheid DNA toegenomen ten opzichte van de hoeveelheid direct na toediening van de vector. Dit duidt volgens de onderzoekers op *in vivo* replicatie in de prostaat.

### **2.3 AAV vectoren**

<b>Totaal gevonden publicaties</b>	<b>12</b>
- Protocol publicatie	5
- Publicaties zonder shedding analyse	1
- Publicaties met shedding analyse	6

Er zijn tot op heden aanzienlijk minder klinische genterapie studies uitgevoerd met een AAV vector in vergelijking met retrovirale en adenovirale vectoren. In Tabel 2.4 worden de belangrijkste bevindingen samengevat. In slechts de helft van het aantal publicaties wordt melding gemaakt over shedding analyse (Tabel 2.4).

**Tabel 2.4 Shedding gegevens in publicaties van klinische gentherapie studies met een AAV vector.**

	Aantal publicaties
Aantal gebruikte shedding assays	
- 1 type assay	3
- 2 typen assays gecombineerd	3
Type shedding assay	
- PCR (niet-kwantitatief)	4
- viruskweek	5
Parameters	Bevindingen
Beschreven assay karakteristieken	detectiegrens, specificiteit
Geanalyseerde monsters	bloed of aanverwante producten, luchtwegmonsters (neus, keel, sputum, BAL), urine, ontlasting, semen
Tijdstippen shedding analyse	direct na toedienen van de vector, in de 1 <sup>e</sup> 7-14 dagen
Shedding data	PCR: viraal DNA gedetecteerd in bloed in 1 <sup>e</sup> 24 uur na toediening van de vector

De volgende conclusies kunnen getrokken worden uit de gevonden gegevens:

**(1) Type shedding assay**

- In drie publicaties werd gebruik gemaakt van een combinatie van viruskweek en PCR voor analyse op shedding. In twee publicaties werd gebruik gemaakt van alleen de viruskweek en in één publicaties werd alleen een PCR toegepast. In alle gevallen werd een niet-kwantitatieve PCR toegepast.

**(2) Karakteristieken van shedding assays**

- In vijf publicaties werd de gevoeligheid van de shedding assay vermeld. De PCR was in drie publicaties vector-specifiek en in één publicatie werd hierover geen informatie verstrekt.

**(3) Monsters**

- In vijf van de zes publicaties werd de vector intranasaal of via inhalatie toegediend voor de behandeling van cystische fibrose. Monsters voor analyse op shedding werden in deze studies voornamelijk genomen uit de luchtwegen (neusuitstrijkje, keeluitstrijkje, sputum, BAL). In vier van de zes publicaties werd daarnaast bloed of aanverwante producten afgenomen voor shedding analyse. In één studie is semen getest op shedding (Kay, Manno et al. 2000).

**(4) Tijdstip shedding analyse**

- Over het algemeen genomen werd shedding analyse verricht direct na toedienen van de vector en in de 1<sup>e</sup> 7-14 dagen.



## (5) Shedding data

- In één van de publicaties werd op geen enkel moment infectieus virus of viraal DNA gedetecteerd. Infectieus virus werd met de viruskweek gedetecteerd in de helft van de publicaties op dag 0-1. In twee publicaties werd viraal DNA gedetecteerd met PCR tot maximaal 48 uur na toediening van de vector.
- Er is binnen de hier uitgevoerde literatuurstudie één studie gevonden waarin semen is geanalyseerd op shedding. Hierbij zijn geen aanwijzingen gevonden voor shedding naar semen. Voor meer informatie wordt verwezen naar hoofdstuk 7 “Kiemceltransmissie”.

## 2.4 *ALVAC vectoren*

<b>Totaal gevonden publicaties</b>	<b>85</b>
- Protocol publicatie	5
- Publicaties zonder shedding analyse	71
- Publicaties met shedding analyse	9

Ongeveer de helft van de 85 gevonden publicaties betrof een preventieve vaccinatie studie voor met name HIV. De overige publicaties verhandelden over een immunogentherapie studie voor tumoren. Bij immunogentherapie wordt het afweersysteem van de patiënt gestimuleerd om de tumor te bestrijden. De vector kan hierbij een stimulator van het afweersysteem tot expressie brengen, zoals bijvoorbeeld het cytokine interleukine-2. Een andere vorm is immunotherapie vaccinatie, waarbij de vector een tumor antigeen tot expressie brengt wat een tumor-specifieke afweerreactie teweeg kan brengen. In negen publicaties (11%) werd op enige wijze melding gemaakt van shedding analyse (Tabel 2.5). Zes publicaties presenteerden resultaten over immunogentherapie studies, waaronder twee immunotherapie vaccinatie studies.

**Tabel 2.5 Shedding gegevens in publicaties van klinische genterapie studies met een ALVAC vector.**

	Aantal publicaties
Aantal gebruikte shedding assays	
- 1 type assay	6
- 2 typen assays	3
Type shedding assay	
- PCR	3
- viruskweek	9
Parameters	Bevindingen
Beschreven assay karakteristieken	detectiegrens, specificiteit
Geanalyseerde monsters	huid, urine, bloed, sputum, keeluitstrijkje, neusuitstrijkje, ontlasting
Tijdstippen shedding analyse	voor toediening, daarna geregeld in de eerste maand na toediening
Shedding data	kweken van huid positief tot max 6-26 dagen, kweken van huid buiten verband allen negatief, andere monsters allen negatief

De volgende conclusies kunnen getrokken worden uit de gevonden gegevens:

**(1) Type shedding assay**

- In alle negen publicaties werd gebruik gemaakt van de viruskweek als shedding assay. In drie publicaties werd daarnaast de PCR gebruikt, waarvan in één publicatie werd vermeld dat het een niet-kwantitatieve assay betrof.

**(2) Karakteristieken van shedding assays**

- In twee publicaties wordt de gevoeligheid van de shedding assay vermeld. De PCR was in twee publicaties vector-specifiek en in één publicatie werd hierover geen informatie verstrekt.

**(3) Monsters**

- In vijf publicaties over preventieve of immunotherapie vaccinatie studies werden kweken van de huid rondom de toedieningsplaats van de vector geanalyseerd (Cooney, Collier et al. 1991; Graham, Belshe et al. 1992; Borysiewicz, Fiander et al. 1996; Corey, McElrath et al. 1998; Baldwin, van der Burg et al. 2003). In deze publicaties werd de vector intradermaal toegediend bij vrouwen met cervixcarcinoom of bij HIV-seronegatieve vrijwilligers. Alleen in de studie van Corey werd de vector niet intradermaal maar intramusculair toegediend bij HIV-negatieve vrijwilligers. Na toediening van de vector ontstond na ongeveer twee dagen rondom de toedieningsplaats een wond, waarna kweken werden genomen van wondvocht en de wond werd afgedekt met gazen. Ook zijn kweken

genomen van de huid buiten de afdekking met gazen om te analyseren of mogelijk besmet wondvocht effectief tegengehouden werd met de gazen. In de vier andere publicaties (één preventieve vaccinatie studie en drie immunogentherapie studies) werden bloed, urine, ontlasting en monsters uit de luchtwegen geanalyseerd.

#### **(4) Tijdstip shedding analyse**

- In de tijdstippen van shedding analyse zitten grote verschillen, waardoor vergelijking van de publicaties bemoeilijkt wordt. Over het algemeen genomen werd analyse uitgevoerd voor toediening van de vector tot maximaal 21 dagen. In één publicatie waarbij de vector intramusculair werd toegediend voor vaccinatie tegen cytomegalovirus vond shedding analyse plaats tot 208 dagen na toediening (Adler, Plotkin et al. 1999).

#### **(5) Shedding data**

- Bij analyse van de huidmonsters werd in drie van de vijf publicaties waarin huid werd geanalyseerd virus gedetecteerd in kweken direct van de wond. De laatste dag van detectie van virus varieert van 6 tot 26 dagen. Alle kweken genomen vanaf de buitenkant van het wondgaas bleken negatief, wat suggereert dat het afdekken van de wond met gazen een effectieve barrière biedt tegen verspreiding van virus uit wondvocht. In geen van de andere monsters is op enig tijdstip shedding gedetecteerd.
- In de immunogentherapie studie van Borysiewicz, waarbij patiënten met baarmoederhalskanker intradermaal gevaccineerd werden met een vector coderend voor bepaalde eiwitten van het humaan papillomavirus, is ook specifiek de omgeving van de patiënten geanalyseerd op shedding (Borysiewicz, Fiander et al. 1996). Het betrof monsters van meubilair, beddengoed en de lucht die gedurende de periode van 10 tot 14 dagen waarin de patiënten in volledige isolatie verbleven werden verzameld. Er werd in deze monsters geen infectieus virus aangetroffen. In het artikel wordt vermeld dat op basis van deze bevindingen formele goedkeuring is verkregen om vervolgstudies op de polikliniek uit te voeren onder ingeperkt gebruik condities.

### **2.5 Karakteristieken van in literatuur gebruikte shedding assays**

Uit de hierboven gepresenteerde data blijkt dat in een beperkt aantal van de publicaties informatie is opgenomen over de assay karakteristieken, en dan met name de specificiteit en de gevoeligheid. Specificiteit werd alleen vermeld voor PCR, waarbij is gevonden dat in het merendeel van die studies die hierover melding maken een vector-specifieke PCR is toegepast. Gevoeligheid werd zowel voor PCR als viruskweek en ELISA gerapporteerd. De

waarde waarin de gevoeligheid wordt uitgedrukt blijkt echter sterk uiteen te lopen (zie bijlage 9.5). Voor een PCR wordt in de verschillende publicaties gevoeligheid bijvoorbeeld uitgedrukt in aantal kopieën per hoeveelheid cellen, vector particles per ml en pfu per ml. De gevoeligheid van een viruskweek wordt onder andere uitgedrukt als pfu per ml en infectieuze units per ml. Door deze verschillen is het vergelijken van de gevoeligheid van de verschillende assays en daarmee ook het vergelijken van shedding data moeilijk. In het algemeen (zeker voor AAV) kan een kwantitatieve PCR in vergelijking met een viruskweek wel als een gevoeliger assay beschouwd worden.

### **3. Shedding analyse in Nederlandse klinische genterapie studies**

Om een overzicht te krijgen van de shedding data en de toegepaste shedding assays bij klinische genterapie studies in Nederland is een inventarisatie gemaakt van zowel voltooide als nog lopende studies. Voor het verzamelen van de gegevens is als basis gebruik gemaakt van een overzicht van de afgegeven vergunningen voor introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde organismen ten behoeve van Nederlandse klinische genterapie studies (Bijlage uit rapport Kaptein (Kaptein 2005)). Dit is aangevuld met de meest recente studies. Het overzicht bestaat in totaal uit 35 aanvragen voor klinische studies (zie bijlage 9.6). Een virale vector (retrovirus, adenovirus, AAV of ALVAC) wordt in 27 aanvragen gebruikt. Bij acht aanvragen voor een virale genterapie studie werd de studie uiteindelijk niet uitgevoerd. De redenen hiervoor zijn terug te vinden in van bijlage 9.6. Daarnaast zijn in drie gevallen twee aanvragen die dezelfde studie betreffen. Uiteindelijk zijn 16 virale genterapie studies die in Nederland zijn of worden uitgevoerd bestudeerd voor dit project. Hiertoe zijn de principal investigators geïnterviewd aan de hand van een sjabloon (bijlage 9.7) of is algemene informatie verkregen uit het dossier van bureau GGO.

#### **3.1 *Retrovirale vectoren***

In Nederland zijn vier verschillende studies uitgevoerd waarbij gebruik is gemaakt van een retrovirale vector. Hieronder wordt een overzicht gegeven van de belangrijkste verzamelde data en conclusies:

- Uit de informatie verzameld uit publicaties over de studie (Hoogerbrugge, Vossen et al. 1992; Hoogerbrugge, van Beusechem et al. 1996) en verkregen via de principal investigator kan niet herleid worden of in de studies BGGO 91-008 en BGGO 93-008 shedding analyse is uitgevoerd.
- In twee studies, waarvan één studie loopt (BGGO 97-014) en één studie nog van start moet gaan (BGGO 97-020), worden cellen *ex vivo* getransduceerd met behulp van een retrovirale vector. Bij deze vorm van genterapie wordt geen virus ingebracht in de patiënt, maar alleen de getransduceerde cellen. Tijdens de productie van getransduceerde cellen wordt verschillende malen getest op het voorkomen van RCR. Als het voorkomen van RCR in alle productiestappen is uitgesloten, wordt shedding analyse niet verplicht gesteld.

- In de studies BGGO 95-004 en BGGO 95-015 werd de retrovirale vector intratumoraal toegediend in hersentumoren. Het betreft hier een multicenter Fase I/II studie en een multicenter Fase III studie waaraan twee klinische centra uit Nederland (LUMC en UMCG) hebben meegewerkt. In de Fase I/II studie zijn in totaal 48 patiënten behandeld (Shand, Weber et al. 1999) en in de Fase III studie zijn in totaal 248 patiënten behandeld (Rainov 2000). Shedding analyse vond plaats met een PCR waarvan de karakteristieken niet bekend zijn. In de Fase I/II studie werd in 17 van de in totaal 48 behandelde patiënten op enig moment vector DNA in bloed gedetecteerd (Shand, Weber et al. 1999). In gonadaal weefsel verkregen na autopsie (zeven mannen en zeven vrouwen) werd geen vector DNA aangetoond. In de Fase III studie werd in 9 van de 248 behandelde patiënten vector DNA aangetroffen in bloed op dag 28 na toediening. Monsters afgenomen van patiënten na 17 weken waren negatief. Eveneens werd geen vector DNA gevonden in gonadaal weefsel van acht mannen en vier vrouwen (Rainov 2000).

### **3.2 Adenovirale vectoren**

In Nederland zijn zeven studies uitgevoerd waarbij een adenovirale vector werd gebruikt. Van de studie BGGO 95-014 werd geen publicatie gevonden en ook benadering van de principal investigator gaf geen verdere informatie. Hieronder volgen de belangrijkste data en conclusies van de zes klinische studies met adenovirale vectoren:

- In vijf studies werd de virale vector intratumoraal ingebracht bij verschillende typen tumoren (oppervlakkige solide tumoren, maligne glioblastoom, prostaatkanker, leverkanker en hoofdhalskanker). In één studie (BGGO 03-001) werd de virale vector intra-articulair ingebracht bij heupprothesen.
- In twee studies (BGGO 98-007 en BBGO 99-015) werd gebruik gemaakt van een viruskweek. In studie BGGO 03-001 werd een kwantitatieve PCR toegepast. De ELISA werd gebruikt in drie studies, te weten BGGO 96-007, BGGO 01-001 en BGGO 01-004, als shedding assay. In studie BGGO 96-007 betrof dit de Adenoclone van Cambridge Biotech (Worcester, Massachusetts, USA) en in de andere twee studies de IDEIA™ Adenovirustest van DakoCytomation Ltd (Ely, United Kingdom). Naast de ELISA werd in studie BGGO 96-007 ook gebruik gemaakt van een FACS analyse in combinatie met een PCR.
- Bij vier studies was de PI op de hoogte van de gevoeligheid van de shedding assay. De ELISA had in studie BGGO 96-007 een detectiegrens van  $3 \times 10^7$ - $3 \times 10^8$  pfu/ml in urine,

bloed, neusuitstrijkje en ontlasting monsters. Voor de studies BGGO 01-001 en BGGO 01-004 werd dezelfde ELISA gebruikt met een detectiegrens van  $2 \times 10^5$  VP in bloed, keeluitstrijkje, urine en ontlasting. De kwantitatieve PCR gebruikt in studie BGGO 03-001 heeft een detectiegrens van 50-250 kopieën/ml in neus- en keeluitstrijkjes, bloed, urine, ontlasting en gewrichtsvloeistof. Van de gebruikte viruskweek in studies BGGO 98-007 en BGGO 99-015 zijn geen karakteristieken bekend.

- Bij studie BGGO 03-001 is met de kwantitatieve PCR twee dagen nadat de vector intra-articulair werd toegediend vector DNA gedetecteerd in gewrichtsvloeistof van alle patiënten. De andere afgenomen monsters bleken vrij van vector DNA. In alle andere adenovirale studies werd geen shedding gedetecteerd.

### **3.3 *AAV vectoren***

In Nederland lopen momenteel twee studies uitgevoerd met een AAV vector. Hieronder volgt de informatie die tot nu toe bekend is van deze studies:

- In studie BGGO 03-008 worden cellen met behulp van AAV gemodificeerd en daarna als vaccin intradermaal toegediend aan patiënten met hormoon-ongevoelig prostaatkanker. Bij deze studie wordt geen shedding analyse uitgevoerd. Een mogelijke verklaring kan zijn dat shedding analyse niet uitgevoerd hoeft te worden indien de gemodificeerde cellen geen vrije viruscellen of viruspartikels bevatten.
- Voor studie BGGO 05-001, welke in samenwerking met AMT wordt uitgevoerd, is begin 2005 goedkeuring aangevraagd. In deze studie worden patiënten in opdracht van AMT met een deficiëntie voor lipoproteïne lipase behandeld met een intramusculaire toediening van AMT-010. AMT-010 is een AAV vector coderend voor lipoproteïne lipase variant S447X. Vanuit het protocol is bekend dat shedding gemeten zal worden in serum, sputum, urine en semen met behulp van een kwantitatieve, vector-specifieke PCR (detectiegrens 10-100 vector kopieën in 1 µg genomisch DNA). Deze studie is in augustus 2005 gestart.

### **3.4 *ALVAC vectoren***

In Nederland zijn twee studies uitgevoerd met een ALVAC vector. In deze studies is geen shedding analyse verricht, de reden hiervoor is onduidelijk. In studie BGGO 01-005 werd de ALVAC vector intraveneus of intradermaal als vaccin toegediend. In studie BGGO 95-010 werd ALVAC intraveneus toegediend.

**Tabel 3.1: Overzicht van shedding data van klinische gentherapie studies in Nederland**

P.I. (BGGO nummer)	Ziekte en Gen	Aantal pt	Wijze en aantal toedieningen	Dosis	Type shedding assay	Karakteristieken shedding assay	Geteste monsters	Tijdstip shedding analyse	Shedding data	Publicatie
<b>Retrovirus</b>										
<sup>A,C</sup> Prof.dr. D Valerio (91-008/93-008)	SCID; ADA	3	i.v., eenmalig	-	-	-	-	-	-	(Hoogerbrugge, Vossen et al. 1992; Hoogerbrugge, van Beusechem et al. 1996)
<sup>A,B,C</sup> Dr. GAP Hoppers / Prof.dr. FJ Cleton (95-004/95-015)	Recidief glioblastoma multiforme; HSV-TK	296 <sup>#</sup>	i.t.; eenmalig	10 <sup>8</sup> cellen/ml	non-qPCR	-	PBMC	2 en 5wk, 2, 4, 10 en 12mnd, daarna jaarlijks	17 pt testen ten minste 1 maal pos voor vector DNA (8/24 pos op 14d, 8/46 pos op 28d), Geen RCR gedetecteerd	(Shand, Weber et al. 1999; Rainov 2000)
<sup>A,C</sup> Dr. CHJ Lamers (97-014)	Gemetastaseerd niercelcarcinoom; ScFv(G250)-CD4 $\gamma$	3	<i>Ex-vivo</i> transductie van T-cellen	nvt	Nvt	-	-	-	-	(Lamers, Willemsen et al. 2002; Lamers, Sleijfer et al. 2004)
<sup>A</sup> Prof.dr. A Hagenbeek (97-020)	Recidief hematologische maligniteit na eerdere BMT; HSV-TK	-	<i>Ex-vivo</i> transductie van T-cellen	nvt	Nvt	-	-	-	-	-
<b>Adenovirus</b>										
<sup>A,B,C</sup> Dr. GAP Hoppers (96-007)	Oppervlakkige solide tumoren; wild-type p53	2 (6) <sup>*</sup>	i.t.; eenmalig	2x10 <sup>7</sup> -5x10 <sup>8</sup> PFU	ELISA / FACS + PCR	detectiegrens ELISA: 3x10 <sup>7</sup> -3x10 <sup>8</sup> PFU/ml	u, f, ser, nu	Dag 0, 1 en 2	Geen shedding gedetecteerd	(Dummer, Bergh et al. 2000)
<sup>A,C</sup> Prof.dr. PAE Sillevius Smitt (98-007)	Maligne glioblastoom; IG.Ad.MLPI.TK	14	i.t.; eenmalig	4.6x10 <sup>8</sup> -4.6x10 <sup>11</sup> VP	Virusweek	-	sp, bl, u, f, wv	Alles: dagelijks tot 2x negatief	Geen shedding gedetecteerd	(Smitt, Driesse et al. 2003)
<sup>A,C</sup> Prof.dr. CH Bangma (99-015)	Prostaatcancer; HSV-TK	12	i.t.; eenmalig	9x10 <sup>9</sup> -9x10 <sup>11</sup> VP	Virusweek	-	sp, u, ser, pw	ku/u/ser: 1-14d, pw: tijdens OK (dag14)	Geen shedding gedetecteerd	(van der Linden, Haagmans et al. 2005)
<sup>A,C</sup> Dr. WR Gerritsen (01-001)	Levercancer; ntr (CTL102)	3(18) <sup>*</sup>	i.t.; eenmalig	10 <sup>8</sup> -5x10 <sup>11</sup> VP	ELISA	ELISA; detectiegrens: 2x10 <sup>5</sup> VP	plasma, ku, u, f	pre, 24h	Geen shedding gedetecteerd	(Palmer, Mautner et al. 2004)
<sup>A</sup> Dr. A Westermann (01-004)	Hoofdhalskanker; ntr (CTL102)	-	i.t.; eenmalig	-	ELISA	ELISA; detectiegrens: 2x10 <sup>5</sup> VP	plasma, ku, u, f	-	-	-
<sup>A,C</sup> Dr. RGHH Nelissen (03-001)	Loszittende heupprothesen; ntr (CTL102)	12	i.a.; eenmalig	3x10 <sup>9</sup> -1x10 <sup>11</sup> VP	qPCR	detectiegrens: 50-250 kopieën/ml	nu, ku, bl, f, u, gv	Nu, ku, bl, f, u: 24h na toediening Gv: 2d na toediening	Geen shedding gedetecteerd in nu, ku, bl, f of u; gv: alle monsters positief voor vector DNA	(de Poorter, Tolboom et al. 2005)



P.I. (BGGO nummer)	Ziekte en Gen	Aantal pt	Wijze en aantal toedieningen	Dosis	Type shedding assay	Karakteristieken shedding assay	Geteste monsters	Tijdstip shedding analyse	Shedding data	Publicatie
<b>Adeno-associated virus</b>										
<sup>A</sup> Dr.WR Gerritsen (03-008)	Hormoon refractair prostaatca.; hgGM-CSF	9	i.d.: totaal 13 toedieningen	1 <sup>e</sup> vaccin: 5x10 <sup>8</sup> cellen, daarna 3x10 <sup>8</sup> cellen	Shedding analyse wordt niet verricht	-	-	-	-	-
<sup>B</sup> Dr.E.Stroes (05-001)	Lipoproteïne lipase deficiëntie; lp1 <sup>S447X</sup>	-	i.m.; 40-80 maal toediening	1x10 <sup>11</sup> -1x10 <sup>12</sup> gc/kg	Kwantitatieve PCR	Sensitiviteit: 10-100 vc DNA in 1 µg genomisch DNA	ser, sp, u, sem	-2w, 1 en 2d, daarna 1-2 wekelijks totdat 3 oopen volgende testen negatief zijn	-	-
<b>ALVAC</b>										
<sup>A,B</sup> Dr. GAP Hospers/ Pasteur Merieux Con. (95-010/ 97-005)	Oppervlakkige solide tumoren; IL-2	15 (3) <sup>*</sup>	i.t.; eenmalig	10 <sup>5</sup> -10 <sup>7</sup> CCID <sub>50</sub>	Shedding analyse wordt niet verricht	-	-	-	-	-
<sup>C</sup> Pasteur Merieux Con/Dr. S Osanto (99-018/01-005)	Melanoma; miniMAGE-1/3	1 (40) <sup>*</sup>	i.d./s.c.; 4 maal	1,23x10 <sup>7</sup> CCID <sub>50</sub>	Shedding analyse wordt niet verricht	-	-	-	-	(van Baren, Bonnet et al. 2005)

<sup>#</sup> Het betreft hier een multicenter Fase I/II studie en een multicenter Fase III studie waaraan twee klinische centra uit Nederland hebben meegewerkt. In de Fase I/II studie zijn in totaal 48 patiënten behandeld (Shand, Weber et al. 1999; Rainov 2000) en in de Fase III studie zijn in totaal 248 patiënten behandeld (Shand, Weber et al. 1999; Rainov 2000). De shedding data refereren naar de Fase I/II studie, waarbij voor 17 van de 48 patiënten shedding is waargenomen

<sup>\*</sup> Multicenter studie waarbij eerst genoemd staat hoeveel patiënten geïncludeerd zijn onder dit BGGO nummer en tussen haakjes het totaal aantal geïncludeerde patiënten in de gehele studie.

<sup>A</sup> Informatie verzameld door middel van interview/telefooncontact/mailcontact met principal investigator of onderzoeker

<sup>B</sup> Informatie verzameld door middel van dossier van Bureau GGO of online vergunningen database ([www.vrom.nl/ggo-vergunningverlening](http://www.vrom.nl/ggo-vergunningverlening))

<sup>C</sup> Informatie verzameld uit publicaties over de studie (referentie publicatie zie laatste kolom van de Tabel)

(-) Hiervan is geen informatie bekend

Afkortingen: bl: bloed, d: dagen, f: faeces, gc/kg: vector genoom kopieën per kilogram lichaamsgewicht, gv: gewrichtsvloeistof, h: hour (uur), hw: hersenweefsel bij resectie of autopsie, i.a.: intra-articulair, i.m.: intramusculair, i.t.: intratumoraal, ku: keeluitstrijkje, NB: niet bekend, nu: neusuitstrijkje, nvt: niet van toepassing, PBMC: perifere bloed mononucleaire cellen, P.I.: principal investigator, pw: prostaatweefsel, sem: semen (sperma), ser: serum, sp: speeksel, u: urine, vc: vector kopieën, VP: vectorpartikels, w: weken, wv: wondvocht.

## 4. Shedding assays in gebruik door het bedrijfsleven

Publicaties in de literatuur over shedding assays en shedding analyse bij klinische genterapie studies zijn veelal afkomstig uit de academische wereld en betreffen voornamelijk Fase I studies. De farmaceutische industrie zal over de klinische ontwikkeling van een genterapeuticum pas naar buiten treden indien de registratie procedure succesvol is doorlopen. Gezien het feit dat de klinische en commerciële ontwikkeling van genterapie zich nog in een vroege fase bevindt, zal de rol van regelgevende instanties bij de gepubliceerde academische investigator-initiated genterapie studies minder prominent zijn geweest. Shedding analyse dat toegepast wordt bij klinisch onderzoek met als doel het genterapeuticum op termijn als geneesmiddel te registreren is voor dit project zeer interessant. Het klinisch onderzoek, inclusief shedding analyse, wordt namelijk uiteindelijk beoordeeld door de regelgevende instantie waarbij registratie wordt aangevraagd. De farmaceutische industrie zal op die grond bij de ontwikkeling en toepassing van shedding assays de richtlijnen van regelgevende instanties volgen. Daarom is voor dit project een aantal farmaceutische bedrijven die genterapie als speerpunt hebben benaderd om informatie in te winnen over hun strategie voor de ontwikkeling en toepassing van shedding assays. Omdat dit soort activiteiten vaak wordt uitbesteed aan Contract Research Organizations (CROs), is eveneens contact opgenomen met dit soort bedrijven. De benaderde bedrijven ontwikkelen voornamelijk genterapie met retrovirale en adenovirale vectoren. Dit hoofdstuk beperkt zich daarom voornamelijk tot deze twee type vectoren en beschrijft daarnaast een studie met AAV. De bevindingen worden hieronder verder uitgewerkt.

### 4.1 *Retrovirale vectoren*

**EUFETS AG** (European Institute for Research and Development of Transplantation Strategies, Idar-Obenstein, Duitsland, [www.eufets.com](http://www.eufets.com)) biedt verschillende diensten aan op het gebied van hemopoïetische stamcel transplantatie alsook op het gebied van somatische genterapie. Het bedrijf test klinische retrovirale vector batches en getransduceerde (stam)cellen op de aanwezigheid van RCR. In de klinische studies waarin EUFETS tot nu toe geparticipeerd heeft, is na een negatieve analyse op RCR in de virusbatch geen shedding analyse verricht in patiënten (*gebaseerd op telefonisch interview met Dr. Klaus Kühlcke, Head of Department of Gene Therapy*).

**MicroSafe B.V.** (Leiden, [www.microsafe.nl](http://www.microsafe.nl)) ontwikkelt en valideert shedding assays voor virale vectoren in opdracht van farmaceutische bedrijven. Dit bedrijf heeft een gevalideerde assay ontwikkeld voor de analyse van RCR in retrovirale gentherapie producten/vectorbatches. Tot op heden zijn er geen shedding assays voor retrovirale vectoren ontwikkeld. De reden hiervoor is dat in Nederland, net als in Duitsland, door de regelgevende instanties opgelegd is dat een vector batch geen RCR mag bevatten. Dientengevolge hoeft geen shedding analyse uitgevoerd te worden (*gebaseerd op telefonisch interview met Dr. Sandra Janaindunsingh, Manager Research and Development*).

**Covance Inc.** (biotechnologie afdeling gevestigd in Harrogate, Engeland, [www.covance.com](http://www.covance.com)) biedt allerlei ondersteunende diensten aan bij het uitvoeren van preklinische of klinische studies onder andere op het gebied van de gentherapie. Voor retrovirale vectoren heeft deze CRO een kwantitatieve en vector-specifieke PCR voor de detectie van RCR in bloedmonsters ontwikkeld en gevalideerd volgens de ICH Q2A en Q2B richtlijnen (zie hoofdstuk 6 voor nadere uitleg). De detectiegrens van deze test in bloed is 10-100 kopieën/ml monster. Deze shedding assay is toegepast in preklinische studies (*gebaseerd op telefonisch interview met Dr. D. Galbraith, Head of Biosafety*).

## 4.2 *Adenovirale vectoren*

**BioReliance** (Stirling, Engeland, [www.bioreliance.com](http://www.bioreliance.com)) is een CRO die ondersteuning aanbiedt op de uitvoering van klinische gentherapie studies. Het bedrijf heeft shedding analyse uitgevoerd voor twee studies met een replicatie-deficiënte adenovirale vector voor de behandeling van cardiale ischaemie uitgevoerd door een niet nader geïdentificeerd farmaceutisch bedrijf. Shedding analyse is uitgevoerd met behulp van een viruskweek in bloed, urine, ontlasting en keeluitstrijkjes. Voor de eerste, Fase I studie uitgevoerd in de Verenigde Staten was analyse van bloed en urine voldoende. De uitbreiding van de monsters met ontlasting en keeluitstrijkjes werd gevraagd door regelgevende instanties in Europa waar de Fase III studie van dit farmaceutische bedrijf plaatsvindt. Na 2 weken kweken van 293 cellen in de aanwezigheid van het betreffende monster wordt het cytopathisch effect vastgesteld. Indien de viruskweek een positieve uitslag geeft, wordt het materiaal verder onderzocht op de aanwezigheid van de adenovirale vector. De detectiegrens van de viruskweek is < 150 IU/ml voor bloed, < 100 IU/ml voor urine, < 80 IU/ml voor keeluitstrijkje en < 75 IU/ml voor ontlasting. De specificiteit van de assay wordt gecontroleerd door gebruik te maken van een positieve (adenovirale vector) en een negatieve controle (verdunningsmedium). De viruskweek is ontwikkeld gebaseerd op de FDA richtlijn

“Bioanalytical Method Validation” ([www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf](http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf)) en de ICH richtlijnen Q2A en Q2B. Voor de Fase III studie, die op het moment van het interview nog lopende was, worden monsters afgenomen voor behandeling, 6, 12, 24 uur en vervolgens dagelijks tot een week na de toediening van de vector. Bij de Fase III studie is het farmaceutisch bedrijf overeengekomen met de nationale regelgevende instanties van de landen die participeren dat alleen shedding analyse gedaan hoeft te worden bij de eerste 50 patiënten (in totaal zullen 450 patiënten worden geïncludeerd). Shedding analyse van deze 50 patiënten wordt gezien als een representatieve groep voor het trekken van conclusies over het voorkomen van shedding in de totale patiëntenpopulatie. Tot het moment van het interview is in geen enkel patiëntenmonster shedding geconstateerd (*gebaseerd op telefonisch interview met Dr. Andrew Chadder, Bioanalytical Services Manager*).

**Covance Inc.** (zie subparagraaf 4.1 voor informatie over het bedrijf) heeft een kwalitatieve viruskweek voor replicatie-deficiënte adenovirale vectoren ontwikkeld volgens de ICH richtlijnen Q2A en B. Hierbij wordt gebruik gemaakt van 293 cellen. De test is door drie farmaceutische bedrijven toegepast in klinische gentherapie studies, waaronder een Fase I/II studie met een niet-replicerende adenovirale vector coderend voor vascular epithelial growth factor (VEGF) voor cardiale toepassing. In deze studie zijn ontlasting, bloed en urine geanalyseerd op shedding voor en na toediening van de vector en gedurende de follow-up. Op dag 1 en 2 na vector toediening is hierbij infectieus virus aangetroffen in ontlasting en urine, maar niet in bloed. Deze data zijn nog niet gepubliceerd (*gebaseerd op telefonisch interview met Dr. D. Galbraith, Head of Biosafety*).

**GenVec Inc.** (Gaithersburg, USA, [www.genvec.com](http://www.genvec.com)) is een farmaceutisch bedrijf dat onder andere gentherapie ontwikkelt voor de behandeling van kanker, hartziekten en oogafwijkingen. Voor shedding analyse van replicatie-deficiënte adenovirale vectoren maakt dit bedrijf gebruik van een kwalitatieve viruskweek met behulp van 293 cellen en A549 cellen. Deze test is ontwikkeld volgens de ICH richtlijnen Q2A en B en is gekozen omdat op basis van de resultaten een uitspraak gedaan kan worden over shedding van infectieus virus. In een Fase I/II studie met een replicatie-deficiënte adenovirale vector coderend voor TNF- $\alpha$  voor de behandeling van pancreascarcinoom is met deze test geen shedding waargenomen in urine, bloed en keeluitstrijkjes. In een andere Fase I/II studie met een replicatie-deficiënte adenovirale vector coderend voor VEGF voor de behandeling van coronaire hartziekten werd met deze test eveneens geen shedding waargenomen in urine en keeluitstrijkje afgenomen 24 uur na vector toediening. In de praktijk is gebleken dat het op juiste wijze verzamelen en

transporteren van monsters cruciaal is voor een dergelijke biologische shedding assay (gebaseerd op telefonisch interview met Dr. Nita Patel, Vice President, Regulatory Affairs).

**Genzyme** (Cambridge, USA, [www.genzyme.com](http://www.genzyme.com)) is een farmaceutisch bedrijf dat zich richt op gentherapie voor cardiovasculaire ziekten, kanker en genetische afwijkingen. Genzyme heeft geparticipeerd in verschillende Fase I studies met een replicatie-deficiënte adenovirale vector coderend voor het cystic fibrosis transmembraan conductance regulator (CFTR) gen ter behandeling van cystische fibrose. Vector shedding werd hierbij geanalyseerd in urine, neus-, keel- en rectumuitstrijkjes, afgenomen op dag 1, 2, 3, 7, 14, 21 en 28, met een viruskweek gebaseerd op 293 cellen en A549 cellen. De detectiegrens van deze viruskweek is 10 IU per monster. In geen van de monsters van patiënten of personeel dat betrokken was bij de toediening van de vector werd shedding gedetecteerd. Op dit moment voert Genzyme een Fase II studie uit met een replicatie-deficiënte adenovirale vector coderend voor het transgen HIF-1 $\alpha$ /VP16 (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ) voor therapeutische angiogenese bij perifeer vaatlijden. Shedding wordt geanalyseerd in urine en keeluitstrijkjes van een subgroep patiënten voor toediening van de vector en op dag 1 en 7 na toediening van de vector. Indien mogelijk wordt op dag 7 eveneens een semenmonster verzameld voor shedding analyse. Als shedding assay wordt in deze studie gebruik gemaakt van een viruskweek gebaseerd op 293 cellen met een detectiegrens van ongeveer 7 IU per monster en een kwantificeringsgrens van ongeveer 200 IU per monster. Een positieve viruskweek wordt vervolgens verder geanalyseerd met een HIF-1 $\alpha$ /VP16 specifieke realtime PCR met een detectiegrens van 2,5 kopieën per 50  $\mu$ l PCR reactie volume en een kwantificeringsgrens van 1000 kopieën per 50  $\mu$ l PCR reactie volume. Alleen monsters met in beide testen een positief resultaat worden beschouwd als positief voor shedding. De shedding assays zijn ontwikkeld volgens de ICH Q2A en Q2B richtlijnen (gebaseerd op vragenlijst ingevuld door Dr. Geoff Akita, Director Cardiovascular Science).

### **4.3 Adeno-associated virale vectoren**

**Covance Inc.** (zie subparagraaf 4.1 voor informatie over het bedrijf) heeft de veiligheids- en biodistributiestudies uitgevoerd die vermeld staan in de preklinische studie van AMT voor de behandeling van lipoproteïne lipase deficiëntie door middel van intramusculaire vector toediening (Rip, Nierman et al. 2005). Hierbij werd één  $\mu$ g DNA afkomstig van bloed of weefsel (testes, epididymis, ovarium, lever, bijnieren, hersenen, lymfklieren, hart, spier, milt, nieren, longen, beenmerg) per reactie geanalyseerd met kwantitatieve PCR om de aanwezigheid van vector DNA aan te tonen. De Limit of Detection (LOD) van de

kwantitatieve PCR was minder dan 10 kopieën per reactie en de Limit of Quantitation (LOQ) was 10 kopieën per reactie. DNA monsters werden gespiked met 100 kopieën van een vector-positieve DNA controle om te monitoren voor monster-specifieke remming. Hiernaast zijn bloedmonsters geanalyseerd voor anti-AAV antilichamen met behulp van een sandwich ELISA, specifiek voor AAV1 en voor anti-LPL met behulp van een vergelijkbare ELISA die specifiek is voor humaan LPL. In de lopende klinische studie wordt voor shedding analyse door JSW-Research (Forschungslabor GmbH, Graz, Oostenrijk) een PCR toegepast welke vergelijkbaar is met de PCR gebruikt in de preklinische studies en welke gevalideerd is volgens de ICH Q2A+B richtlijnen. Zoals al in subparagraaf 3.3 vermeld staat, heeft deze PCR een detectiegrens van 10-100 vector kopieën in 1 µg genomisch DNA. *(gebaseerd op informatie van Dr. Janneke Meulenberg, Vice President Pre-clinical & Clinical Development, Amsterdam Molecular Therapeutics)*

#### **4.4 Beschouwing van shedding analyse door het bedrijfsleven**

Concluderend kan gesteld worden dat de farmaceutische industrie de ICH Q2A+B richtlijnen hanteert voor de ontwikkeling en validatie van shedding assays (zie Tabel 4.1 voor een samenvatting van de bevindingen). Deze richtlijnen worden verder uitgewerkt in hoofdstuk 6. Voor adenovirale vectoren wordt vooral een viruskweek als shedding assay toegepast. Shedding analyse blijkt voor retrovirale vectoren niet altijd uitgevoerd te hoeven worden, indien is aangetoond dat de vector batch geen replicatie-competente virusdeeltjes bevat. Dit geldt ook voor AAV. Voor de lopende Nederlandse studie BGGO 05-001 heeft AMT zelf besloten om shedding analyse uit te voeren. Vergelijkbaar met resultaten uit de literatuurstudie is in het bedrijfsleven evenmin sprake van uniformiteit in de karakteristieken van de gebruikte shedding assays zoals de gevoeligheid, en in de opzet van de shedding analyse wat betreft te testen excreta en tijdstippen van analyse. De gekozen strategie voor shedding analyse wordt zoals verwacht mede bepaald door regelgevende instanties.

**Tabel 4.1: Samenvatting van shedding analyse door het bedrijfsleven.**

Bedrijf	PCR	Biologische assay	ELISA	Richtlijnen voor ontwikkeling	Opmerkingen
<b><i>Retrovirale vectoren</i></b>					
EUFETS AG	-	-	-	-	RCR bepaling in vector batch voldoende
Microsafe B.V.	-	-	-	-	RCR bepaling in vector batch voldoende
Covance Inc.	kwantitatief, vector-specifiek	-	-	ICH Q2A+B	toegepast in preklinische studies
<b><i>Adenovirale vectoren</i></b>					
BioReliance	-	viruskweek (293 cellen)	-	ICH Q2A+B	toegepast in Fase II studie en Fase III studie
Covance Inc.	-	viruskweek (293 cellen)	-	ICH Q2A+B	toegepast in Fase I/II studies
GenVec Inc.	-	viruskweek (293 + A549 cellen)	-	ICH Q2A+B	toegepast in Fase I en Fase II studies
Genzyme	kwantitatief, vector-specifiek	viruskweek (293 + A549 cellen)	-	ICH Q2A+B	toegepast in Fase I studies en Fase II studie
<b><i>AAV vectoren</i></b>					
Covance Inc.	kwantitatief, vector-specifiek	-	-	ICH Q2A+B	toegepast in preklinische studie

Naast de in deze tabel beschreven bedrijven zijn ook Amsterdam Molecular Therapeutics B.V. (AMT, Amsterdam), het International AIDS Vaccine Initiative (IAVI), NDDO Oncology B.V. (Amsterdam), Genosafe (Evry, Frankrijk), Molmed S.p.A. (Milaan, Italië), Cell Genesys Inc. (Foster City, USA) en Schering Plough (Kenilworth, USA) benaderd. NDDO Oncology kan geen informatie verschaffen over shedding analyse uitgevoerd in de klinische gentherapie studies waarin deze organisatie participeert. IAVI heeft aangegeven niet mee te werken aan dit project. Van Genosafe, Molmed S.p.A., Cell Genesys Inc. en Schering Plough is geen tijdige reactie ontvangen.

## 5. Technische aspecten van shedding assays

In dit hoofdstuk worden de technische aspecten en aandachtspunten van de diverse typen shedding assays die in de literatuur beschreven zijn (hoofdstuk 2), toegepast worden in Nederlandse genterapie studies (hoofdstuk 3) en gebruikt worden door het bedrijfsleven (hoofdstuk 4) nader toegelicht.

### 5.1 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

#### 5.1.1 **Achtergrond van de PCR**

De PCR is een methode om op een snelle manier een specifiek stukje DNA kunstmatig te amplificeren. Hierbij worden twee specifieke primers gebruikt die elk aan één kant van dit specifieke stukje DNA kunnen binden. De eerste stap in de PCR cyclus is de denaturatie van DNA door middel van verhitting, resulterend in enkelstrengs DNA. Tijdens de volgende stap binden de primers aan het complementaire stukje enkelstrengs DNA. Gebruik makend van de gebonden primers als template zorgt een DNA polymerase enzym vervolgens voor DNA synthese. Hierdoor ontstaat een fragment dat precies het stukje DNA tussen de primers bevat. Dit fragment, ook wel amplicon genoemd, wordt vervolgens in de daaropvolgende cycli geamplificeerd. Er zijn verschillende manieren om het amplicon te detecteren, afhankelijk van de gebruikte PCR methode, zoals hieronder nader zal worden toegelicht.

De PCR kan ook worden toegepast voor de detectie van RNA. Hierbij wordt eerst copy DNA (cDNA) gemaakt van het RNA met behulp van het enzym reverse transcriptase, waarna het cDNA vervolgens geamplificeerd kan worden. Een PCR voor RNA wordt ook wel RT-PCR genoemd.

Er zijn grofweg twee vormen van PCR te onderscheiden, namelijk de conventionele, niet-kwantitatieve PCR en de kwantitatieve real-time PCR. De karakteristieken van de conventionele PCR en real-time PCR worden hieronder beschreven.

#### *Conventionele PCR*

Bij de conventionele PCR wordt het amplicon geïdentificeerd op basis van grootte of de DNA sequentie. De grootte van het amplicon kan eenvoudig bepaald worden met behulp van gelelectroforese. Een nadeel is echter dat deze detectiemethode niet specifiek is, omdat er meerdere PCR producten met ongeveer dezelfde grootte ontstaan kunnen zijn. Door gebruik



te maken van probe hybridisatie kan dit nadeel verholpen worden. Dit is echter een extra stap en daardoor meer arbeidsintensief.

Een groot nadeel van conventionele PCR is dat er een aanzienlijk risico van besmetting met DNA fragmenten uit de omgeving bestaat. De PCR en de amplicon detectie kunnen namelijk niet opeenvolgend in een gesloten systeem plaatsvinden. Daarnaast is hier sprake van een eindpuntsbepaling, waarbij gekeken wordt naar de totale hoeveelheid product dat na een bepaalde tijd gevormd is. Bij PCR hangt de totale hoeveelheid product niet alleen af van de hoeveelheid target DNA waarmee gestart is, maar ook van de experimentele omstandigheden. Het gevolg hiervan is dat de conventionele PCR niet kwantitatief is en niet gebruikt kan worden om het aantal DNA kopieën vast te stellen.

### *Real-time PCR*

Real-time PCR is een gevoelige (5-10 kopieën per  $\mu\text{g}$  genomisch DNA) en nauwkeurige methode dat DNA kan kwantificeren over een zeer breed dynamisch bereik van 7-8 log. Deze techniek is begin jaren negentig ontwikkeld. Omdat de accumulatie van het PCR product tijdens de exponentiele fase van de reactie gemeten wordt, is kwantificering van de starthoeveelheid DNA met deze methode wel mogelijk. Hieronder volgt een beknopt overzicht van de real-time PCR. Voor verdere details wordt verwezen naar het handboek "Real-time PCR. An essential guide" van Edwards *et al.* (Edwards, Logan et al. 2004). Bij real-time PCR wordt het PCR product al tijdens de amplicifatie gedetecteerd, in tegenstelling tot de conventionele PCR waarbij detectie pas plaatsvindt als de totale hoeveelheid eindproduct gevormd is. Er zijn twee algemene technieken beschikbaar voor de real-time detectie van het amplicon. De eerste, relatief eenvoudige techniek betreft kleurstoffen die binden aan DNA, zoals SYBR<sup>®</sup> Green 1. Een dergelijk kleurstof is aanwezig in het reactiemengsel en zal binden aan al het dubbelstrengs DNA dat gevormd wordt. De kleurstof zendt pas fluorescentie uit nadat het ingebouwd is in dubbelstrengs DNA, zodat de fluorescentie intensiteit proportioneel zal zijn aan de hoeveelheid gegenereerd amplicon. Een nadeel van deze techniek is echter de lage mate van specificiteit. De kleurstof zal immers ook ingebouwd worden in aspecifieke PCR producten of primer dimeren. Dit probleem speelt een veel minder grote rol bij de tweede detectietechniek. Deze techniek maakt gebruik van amplicon-specifieke gelabelde hybridisatie probes. De Taqman<sup>®</sup> PCR is hiervan een welbekend voorbeeld. In de Taqman PCR wordt een amplicon-specifieke Taqman probe gebruikt die aan de ene kant gekoppeld is aan een fluorescerend reporter label en aan de andere kant aan een zogenaamd quencher label. Het quencher label vangt de fluorescentie

van het reporter label weg, zodat geen signaal wordt uitgezonden. Pas na scheiding van beide labels kan fluorescentie gedetecteerd worden. Dit wordt ook wel het “fluorescence resonance energy transfer (FRET)” principe genoemd. Tijdens de PCR reactie binden zowel de primers als de probe specifiek aan het complementaire DNA. Het *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polymerase zorgt vervolgens voor de DNA synthese, gebruik makend van de primers als template. In tegenstelling tot de primers vormt de probe echter geen template voor DNA synthese, maar wordt door het Taq polymerase dusdanig geknipt dat het reporter label en het quencher label van elkaar gescheiden worden. Dit resulteert in fluorescentie waarvan de intensiteit proportioneel is aan de hoeveelheid gevormd amplicon. Naast de Taqman probes zijn er diverse andere probes beschikbaar die werken volgens het FRET principe (Arya, Shergill et al. 2005). Deze worden hier niet verder besproken.

Er kunnen twee methodes worden toegepast voor de kwantificering van real-time PCR resultaten. De eerste methode maakt gebruik van een absolute kwantificering. Hierbij wordt voor een monster het cyclusnummer waarbij de fluorescentie boven een bepaalde drempel uitkomt, Ct genoemd, vastgesteld. Vervolgens kan op een ijklijn, waarbij de Ct tegen de concentratie van de standaard is uitgezet, de oorspronkelijke hoeveelheid DNA in het monster worden afgelezen. De meest gebruikte standaard is een plasmide met het gen van interesse. Alternatieven zijn een synthetisch enkelstrengs oligonucleotide dat representatief is voor het gehele amplicon of een cellijn met een bekend aantal kopieën van het gen. De tweede methode van kwantificering betreft relatieve kwantificering, waarbij de hoeveelheid amplicon relatief wordt uitgedrukt ten opzichte van een referentie controle.

### **5.1.2 Algemene technische aspecten van PCR**

De efficiëntie en betrouwbaarheid van PCR zijn sterk afhankelijk van diverse experimentele factoren. Bij de ontwikkeling van een PCR dient, naast optimalisatie van het experimentele protocol, rekening gehouden te worden met de volgende technische aspecten.

#### **1. Voorkomen van vervuiling**

De PCR is zeer gevoelig voor vervuiling met DNA-afbrekende enzymen of DNA fragmenten uit de omgeving. Zuiverheid van reagentia is daarom van groot belang.

## 2. Optimalisatie van primers en probe

Primers, en in het geval van real-time Taqman PCR eveneens de probe, dienen zorgvuldig geselecteerd te worden teneinde de specificiteit en de efficiëntie van de PCR te optimaliseren. Hiervoor worden de volgende richtlijnen gehanteerd:

- primers dienen niet complementair aan zichzelf of elkaar te zijn
- de optimale lengte voor een primer bedraagt 15-30 basen met een base G/base C verhouding van 20-80%
- de smelttemperatuur ( $T_m$ ) van Taqman primers moet in het bereik 68-70°C liggen
- voor real-time PCR wordt een kort amplicon met een grootte < 500 baseparen aangeraden
- in een Taqman probe moet geen G base aanwezig zijn aan de 5' kant omdat een G op deze positie de fluorescentie zal wegvangen, ook na het knippen van de probe

## 3. Optimalisatie van magnesiumchloride concentratie

De werkzaamheid van Taq DNA polymerase, het meest toegepaste polymerase, is sterk afhankelijk van de magnesiumchloride concentratie. De optimale concentratie van deze cofactor verschilt tussen primers en wordt beïnvloed door diverse factoren zoals eiwitten en metaalbindende componenten (bijv. EDTA, citraat) aanwezig in het monster.

## 4. PCR remming

Het is bekend dat de PCR reactie geremd kan worden door diverse factoren afkomstig van het monster zelf, waaronder hemoglobine, urea en heparine, of van de middelen gebruikt voor DNA of RNA extractie, zoals ethanol en isopropanol. Een adequaat protocol voor de zuivering van DNA en RNA kan dit probleem voorkomen. Daarnaast dienen controles voor PCR remming uitgevoerd te worden. Hiervoor kan een externe controle, uitgevoerd in een afzonderlijk buisje, of een interne controle worden gebruikt. Een interne controle wordt toegevoegd aan het monster waarvoor een probe met een ander fluorescerend label wordt toegepast.

## 5. Normalisatie van PCR resultaten

Dit aspect is van belang bij RT-PCR van RNA, waarbij monsters met elkaar vergeleken worden. Bij RT-PCR kunnen fouten geïntroduceerd worden door kleine verschillen in de starthoeveelheid RNA, de kwaliteit van het RNA of verschillen in efficiëntie van cDNA synthese en PCR amplificatie. Voor deze verschillen kan gecorrigeerd worden door te normaliseren met behulp van een interne referentie. Hiervoor worden vaak de zogenaamde

“housekeeping” genen als GAPDH of ribosomaal RNA gebruikt. Theoretisch zouden deze genen op vergelijkbaar niveau tot expressie gebracht moeten worden in de verschillende weefsels van een organisme.

### **5.1.3 Aandachtspunten voor shedding analyse door middel van PCR**

#### *Aanbevelingen vanuit de literatuur*

Er is slechts beperkte literatuur beschikbaar over de ontwikkeling van shedding assays. Alleen voor adenovirus zijn twee relevante publicaties gevonden (Saulnier, Vidaud et al. 2003; Wang, Patel et al. 2003). Wang *et al.* beschrijft de ontwikkeling van een niet-kwantitatieve real-time PCR in combinatie met een viruskweek voor de analyse van shedding van een adenoviraal vaccin, namelijk een E1-gedeleteerd adenovirus (Ad5) vector coderend voor het human immunodeficiency virus type 1 gag gen (Ad5HIVgag) (Wang, Patel et al. 2003). Hierbij wordt de PCR uitgevoerd op DNA extracten uit de viruskweek ter bevestiging van de sequentie identiteit van een positieve viruskweek. Het is niet duidelijk of deze shedding assay reeds toegepast wordt in de klinische studies waarnaar het artikel verwijst. In het artikel van Saulnier *et al.* wordt de ontwikkeling van een vector-specifieke en sensitieve real-time kwantitatieve PCR assay voor de kwantificatie van een niet-replicerende adenoviral vector coderend voor p53 (Ad5CMV-p53) in biomaterialen beschreven (Saulnier, Vidaud et al. 2003). Deze assay is gebruikt in een klinische studie waarbij patiënten met recidief plaveiselcelcarcinoom van hoofd en hals de Ad5CMV-p53 vector intratumoraal kregen toegediend.

Omdat de hierboven beschreven artikelen een vector-specifieke PCR beschrijven, is het moeilijk om op basis hiervan aanbevelingen te doen. De review artikelen van Gonin en Lovatt over de toepassing van de PCR bij preklinische genterapie studies zijn voor dit rapport meer relevant (Lovatt 2002; Gonin and Gaillard 2004). Gonin en Gaillard hebben een inventarisatie gemaakt van de analyse van biodistributie, inclusief vector verspreiding naar excreta, in 42 preklinische genterapie studies waarbij zowel virale vectoren als naakt DNA op diverse manieren zijn toegediend aan uiteenlopende soorten proefdieren (muizen, ratten, konijnen, kippen, honden, varkens en apen) (Gonin and Gaillard 2004). In 25% van de studies werd deze analyse uitgevoerd met behulp van real-time kwantitatieve PCR (Taqman, SybGreen of Light Cycler). Andere gebruikte technieken waren niet-kwantitatieve of semi-kwantitatieve PCR, FISH, Southern blot en reporter gen expressie (LacZ, luciferase en GFP). Kort samengevat blijkt dat het merendeel van deze studies monsters van goed doorbloede organen als de lever, milt, longen, nieren, hart en hersenen heeft geanalyseerd, alsmede de

plaats van toediening (bijv. spier, huid) en de drainerende lymfeklieren. Daarnaast zijn in een groot aantal gevallen ook specifieke organen bestudeerd, afhankelijk van de wijze van toediening, type vector en het transgen. Volgens Gonin en Gaillard is de kwantitatieve PCR de techniek van keuze bij biodistributie analyse. Voor de ontwikkeling van een kwantitatieve PCR als biodistributie c.q. shedding assay wordt een aantal aanbevelingen omtrent sensitiviteit, primers en PCR inhibitie gedaan die deels reeds hierboven bij de beschrijving van de technische aspecten van de PCR aan bod zijn gekomen. Een selectie uit deze aanbevelingen is de volgende:

1. *Sensitiviteit*; de PCR reactie wordt sterk beïnvloed door de aanwezigheid van het genomische DNA uit het monster. Daarom moet sensitiviteit bepaald worden in de aanwezigheid van genomisch DNA. Sensitiviteit moet rond de 10-100 kopieën per  $\mu\text{g}$  genomisch DNA liggen (de FDA beveelt voor een kwantitatieve PCR een sensitiviteit van  $< 100$  kopieën/ $\mu\text{g}$  genomisch DNA aan).
2. *Primers*; nested PCR, waarbij een tweede amplificatie ronde wordt uitgevoerd met primers die binnen het amplicon van de eerst toegepaste primers liggen, wordt afgeraden vanwege verhoogd risico op vervuiling en moeilijkheden bij optimalisatie en validatie.

Ook in het review van Lovatt worden aanbevelingen gedaan voor de toepassing van de kwantitatieve PCR voor onder ander vector biodistributie studies in dieren (Lovatt 2002). Deze zijn hierboven reeds aan bod gekomen. Lovatt stelt verder dat de International Conference for Harmonisation (ICH) richtlijnen Q2A en Q2B kunnen worden toegepast bij de ontwikkeling en validatie van een dergelijke assay. Deze richtlijnen komen uitgebreid aan de orde in hoofdstuk 6, paragraaf 6.3.

### *Matrix effecten*

Bij de ontwikkeling van de real-time kwantitatieve PCR voor Ad5CMV-p53 door Saulnier *et al.* is geconstateerd dat de detectielimiet voor gezuiverd vector preparaat een factor tien lager was dan wanneer de vector gespiked werd in plasma (Saulnier, Vidaud *et al.* 2003). Dit bevestigt het belang om tijdens de ontwikkeling van de shedding assay vast te stellen of storende factoren aanwezig zijn in het te meten monster (bijvoorbeeld eiwitten, DNA of RNA in een lichaamsvloeistof) die de testuitslag kunnen beïnvloeden. Een dergelijk storende factor wordt ook wel een matrixeffect genoemd. Matrixeffecten kunnen worden bestudeerd door bekende hoeveelheden vector uit het gehele bereik van de assay toe te voegen aan de te testen matrix (i.e. lichaamsvloeistof zonder vector) en de testresultaten te vergelijken met die resultaten verkregen in de afwezigheid van de matrix. Bij een matrixeffect kan de assay

eventueel verder geoptimaliseerd worden of kan besloten worden om de referentiestandaard ook te meten in aanwezigheid van de matrix. Daarnaast dienen op basis van eventuele matrixeffecten de juiste controles te worden gekozen. Overigens blijft de biologische variëteit van de monsters bestaan en kan niet altijd storing in de PCR van elk monster ondervangen worden.

### *Binding van virale vectoren aan bloedcellen*

In een aantal studies is beschreven dat adenovirus bindt aan rode bloedcellen. In een *in vitro* studie is gebleken dat na incubatie van humane rode bloedcellen met adenovirale deeltjes behorend tot serotype 5 (Ad5), het meest gebruikte serotype voor gentherapie vectoren, tenminste 98% van het virus gebonden is aan de cellen (Cichon, Boeckh-Herwig et al. 2003). Binding van adenovirus aan rode bloedcellen is bevestigd in een *in vivo* studie (Stone, Ni et al. 2005). Hierbij zijn muizen geïnjecteerd met een adenovirale vector behorend tot serotype 5 of 11 (Ad11). Na injectie werd 10 tot 20% van Ad11 teruggevonden gebonden aan bloedcellen. Ook voor Ad5 werd binding waargenomen, alhoewel in mindere mate dan voor Ad11. Dit fenomeen is zeer relevant voor shedding analyse. Shedding wordt vaak bepaald in afgeleide producten van bloed, zoals serum en plasma. Dit betekent dat slechts een deel van de adenovirale vector dat in de circulatie aanwezig is kan worden gedetecteerd.

Binding aan bloedcellen is niet een fenomeen dat uniek is voor adenovirussen. Specifieke receptoren op bloedcellen zijn beschreven voor diverse typen virussen. Bepaling van virus in afgeleide producten als plasma of serum moet daarom beschouwd worden als een afspiegeling van de totale hoeveelheid virus in volbloed. Deze afspiegeling zal per virus verschillen. In dit opzicht zou shedding analyse in volbloed een meer betrouwbaar resultaat kunnen opleveren. Hierbij dient echter rekening gehouden te worden met eventuele technische beperkingen, zoals het gegeven dat hemoglobine aanwezig in volbloed kan storen in een PCR (zie hierboven).

## **5.2 Biologische assays**

Voor het bepalen van shedding van infectieuze virusdeeltjes worden biologische assays gebruikt. Deze assays kunnen de activiteit van de vector op een directe of indirecte manier bepalen. De reproduceerbaarheid van biologische assays is in vergelijking met de PCR aanzienlijk lager door de hogere variabiliteit van een biologisch systeem. Voor adenovirale, AAV en ALVAC vectoren wordt de activiteit direct vastgesteld in een viruskweek, waarbij gekeken wordt naar het effect op bepaalde doelcellen. Kanttekening hierbij is dat viruskweek

van AAV erg omslachtig is, gezien het feit dat AAV geen cytopatisch effect veroorzaakt. Voor retrovirale vectoren worden biologische assays als de S<sup>+</sup>/L<sup>-</sup> assay en de marker rescue assay toegepast om shedding van RCR te bestuderen. Een belangrijk aandachtspunt voor het analyseren van shedding in semen is overigens dat semen toxisch voor cellen kan zijn. Hieronder volgt een beschrijving van de diverse biologische assays die worden toegepast bij shedding analyse.

### 5.2.1 Viruskweek

#### *Achtergrond*

De viruskweek is in de kliniek de standaard methode om infectie met een virus aan te tonen in patiëntenmateriaal. Bij de viruskweek wordt patiëntenmateriaal geënt op zogenaamde doelcellen, waarna infectie van deze doelcellen wordt geanalyseerd. Als doelcellen kunnen een primaire celkweek of cellijnen worden gebruikt (Knipe and Howley 2001). Een celkweek direct afkomstig uit weefsel wordt een primaire celkweek genoemd en bestaat over het algemeen uit een gemengde populatie van epitheliale cellen en fibroblasten. De levensduur van een primaire celkweek is beperkt, na een twintig tot zestigtal delingen gaan de cellen dood. Cellijnen ontstaan uit tumorweefsel en kunnen ongelimiteerd doorgekweekt worden. Meestal wordt dan ook bij viruskweken gebruik gemaakt van cellijnen als doelcellen.

Het vaststellen van een virusinfectie in een viruskweek kan op 4 manieren (Menegus 1991):

- 1 Hemabsorptie; dit is het indirect meten van de virale eiwitsynthese in geïnfecteerde cellen, gedetecteerd door absorptie van erythrocyten op het oppervlak van de geïnfecteerde cel.
- 2 Vorming van inclusie lichaampjes; dit zijn subtiele veranderingen in de intracellulaire structuur van geïnfecteerde cellen.
- 3 Cytopatisch effect (CPE) assay; hierbij worden morfologische veranderingen waargenomen in individuele cellen of groepen van cellen veroorzaakt door de virusinfectie. Cytopatische effecten zijn bijvoorbeeld ronding, krimpen, toegenomen refractiliteit, fusie, aggregatie, verlies van binding of lysis van de cel.
- 4 Immunodetectie assay; het “kleuren” van geïnfecteerde cellen met behulp van monoklonale of polyklonale antistoffen. Dit kan afgelezen worden onder de fluorescentiemicroscop.

De CPE assay wordt veruit het meest toegepast als detectiemethode, maar is alleen geschikt voor cytopathische virussen. Het patroon van CPE dat een virus induceert op een cellijn is specifiek voor het type virus. Onder de microscoop kan dus direct waargenomen worden om

welke virusinfectie het gaat. Een andere methode die veel wordt toegepast is de immunodetectie assay. Deze detecteert geïnfecteerde cellen voordat CPE optreedt, waarmee het vaststellen van een virus in het monster sneller kan plaatsvinden. Wel dient bij deze assay van tevoren bekend te zijn met welk soort virus het monster geïnfecteerd zou kunnen zijn.

Bij het visueel beoordelen van CPE of immunofluorescentie kan alleen de aanwezigheid van viruspartikels in het monster vastgesteld worden. Met deze assays kunnen geen uitspraken gedaan worden over de hoeveelheid virusdeeltjes die initieel in het monster aanwezig waren. Dit is wel mogelijk bij een kwantitatieve viruskweek, welke hieronder nader wordt toegelicht.

#### *Kwantitatieve viruskweek*

Een viruskweek waarbij een uitspraak gedaan kan worden over de hoeveelheid virusdeeltjes aanwezig in het monster is de plaque assay. Hierbij wordt een verdunningsreeks van het monster gemaakt, waarna elke verdunning wordt geënt op de doelcellen. Door het medium visceus te maken wordt voorkomen dat viruspartikels met elkaar in aanraking komen. Na incubatie wordt het aantal ontstane plaques afgelezen per verdunning en kan vervolgens het aantal plaques omgerekend worden naar het aantal plaque forming units per milliliter die in het originele monster aanwezig waren. Een andere mogelijkheid voor het kwantificeren van een positieve viruskweek is het verrichten van een qPCR nadien. Hierbij wordt uit de positieve viruskweek DNA geïsoleerd, wat vervolgens door middel van de qPCR gekwantificeerd wordt zoals hierboven reeds is beschreven.

#### *Algemene technische aspecten van de viruskweek*

De betrouwbaarheid van de viruskweek hangt in grote mate af van de afnametechniek van de monsters en de transport condities. Over het algemeen genomen kan het monster het beste direct aangeleverd worden voor het inzetten op kweek. Bij vertraging dient het monster op ijs te worden vervoerd of ingevroren tot  $-70^{\circ}\text{C}$ . Invriezen van virussen vermindert de levensvatbaarheid en moet zoveel mogelijk voorkomen worden.

#### *Viruskweek toegepast als shedding assay*

De specificiteit is een belangrijk aspect voor de toepassing van de viruskweek bij shedding analyse. Dergelijke shedding assays zijn vaak afgeleid van klinisch toegepaste diagnostische testen, welke bestemd zijn voor de detectie van wildtype virussen en derhalve geen onderscheid zullen kunnen maken tussen de virale vector en het wildtype virus. Dit speelt



vooral een rol bij een niet-replicerende adenovirale vector, aangezien het wildtype virus een veelvoorkomend humaan verkoudheidsvirus is. De beperkte mate aan specificiteit kan in dit geval op een aantal manieren worden ondervangen, zoals hieronder nader wordt toegelicht. Daarnaast is van belang dat voor de te analyseren vector de juiste, eventueel gemodificeerde cellijn wordt gekozen, waarin ook een niet-replicerende vector kan repliceren.

Voor een niet-replicerende adenovirale vector wordt in het algemeen gebruik gemaakt van een 293 cellijn (afkomstig van humane embryonale niercellen) waarin een E1-sequentie is geïntegreerd. In deze cellijn kan een replicatie-deficiënt adenovirus toch repliceren en een cytopathisch effect teweeg brengen. Een alternatief voor 293 cellen is de 911 cellijn (Fallaux, Kranenburg et al. 1996). De specificiteit van de viruskweek voor de niet-replicerende adenovirale vector kan verhoogd worden door monsters naast de 293 cellijn ook te testen op een cellijn zonder een geïntegreerde E1-sequentie, zoals de A549 cellijn (afkomstig van humaan longcarcinoom), HBL-100 cellijn (afkomstig van humane epitheliale cellen uit de borst) of de HeLa cellijn (afkomstig van humane epitheliale cervixcarcinoom). Op deze wijze kan onderscheid gemaakt worden tussen de niet-replicerende vector, welke alleen effect zal hebben op de 293 cellijn, en wild-type adenovirus of RCA, welke op beide cellijnen een effect zullen hebben. Een andere mogelijkheid om de specificiteit van de viruskweek te verhogen is door een positieve viruskweek nader te analyseren met een vector-specifieke PCR (Wang, Patel et al. 2003).

Voor AAV vectoren dient gebruik te worden gemaakt van een adenovirus-geïnfekteerde cellijn, aangezien AAV alleen kan repliceren in aanwezigheid van adenovirus. Een voorbeeld hiervan zijn adenovirus-geïnfekteerde C37 cellen welke afgeleid zijn van de HeLa cellijn en het AAV rep eiwit tot expressie brengen. Omdat AAV een niet-cytopathisch virus is, kan de viruskweek niet op basis van morfologische veranderingen van de doelcellen afgelezen worden. De aanwezigheid van de AAV vector in de doelcellen kan vastgesteld worden aan de hand van een vector-specifieke PCR uitgevoerd op cellysaten na incubatie met het te analyseren monster (Atkinson, Debelak et al. 1998). In de praktijk wordt deze methode als erg bewerkelijk ervaren en niet gezien als een eenvoudige standaardtest.

Voor ALVAC vectoren kunnen in een viruskweek BSC-40 cellen of Vero cellen (afkomstig van niercellen van de African Green Monkey) als doelcellen worden gebruikt, waarna het cytopathisch effect kan worden bestudeerd door het bepalen van het aantal plaques.

### 5.2.2 S<sup>+</sup>/L<sup>-</sup> assay

De sarcoma-positive/leukemia-negative (S<sup>+</sup>/L<sup>-</sup>) assay wordt toegepast voor de analyse van RCR in een retrovirale vector batch en voor RCR shedding analyse. Deze methode is gebaseerd op het principe dat cellen die zowel het muizen sarcomavirus (S) en het muizen leukemievirus (L) tot expressie brengen een specifieke transformatie ondergaan die tot fociforming van cellen leidt. Als doelcellen wordt een cellijn gebruikt die het sarcomavirus bevat (S<sup>+</sup>) maar niet het leukemievirus (L<sup>-</sup>). Een dergelijke cellijn wordt gekweekt in aanwezigheid van het te analyseren monster. Indien RCR aanwezig is in het monster, zullen de doelcellen S<sup>+</sup>/L<sup>+</sup> worden en transformeren. S<sup>+</sup>/L<sup>-</sup> cellijnen die in deze assays kunnen worden gebruikt zijn de D56 cellijn afgeleid van de NIH 3T3 cellijn en de PG-4 kattencellijn. In de literatuur zijn aanwijzingen dat de PG-4 cellijn meer consistent is met duidelijk herkenbare foci (Reeves, Duffy et al. 2002).

Om de gevoeligheid van de S<sup>+</sup>/L<sup>-</sup> assay te verhogen, worden de te analyseren monsters vaak eerst gedurende een aantal passages gekweekt in permissieve cellen teneinde eventueel aanwezig RCR te amplificeren. Hiervoor dient een cellijn gekozen te worden die toegankelijk is voor het te verwachten RCR. Zo worden voor retrovirale vectoren afgeleid van het muizen leukemievirus (MLV) de zogenaamde *Mus dunni* cellen gebruikt. Dit zijn fibroblasten afkomstig uit de staart van een *Mus dunni* muis die gevoelig zijn voor een groot aantal virussen en RCR efficiënt kunnen propageren. *Mus dunni* cellen maken zelf geen endogene retrovirussen, in tegenstelling tot andere muizen cellijnen, waardoor vals-positieve uitslagen uitgesloten kunnen worden. Een theoretische beperking is dat RCR met een humane envelop *Mus dunni* cellen niet kan infecteren. RCR ontstaan door recombinatie van de vector met een endogeen humaan retrovirus zou daardoor gemist kunnen worden. Voor vectoren afgeleid van het gibbon aap leukemievirus (GALV) zijn humane cellen meer geschikt.

### 5.2.3 Marker rescue assay

Naast de S<sup>+</sup>/L<sup>-</sup> assay wordt voor de analyse van RCR shedding ook gebruik gemaakt van de marker rescue assay. Bij deze methode wordt een niet-replicerende retrovirale vector dat codeert voor een marker gen, bijvoorbeeld neomycine, ingebracht in cellen die gebruikt worden voor virus amplificatie, zoals NIH 3T3 cellen. Indien dit marker gen in aanwezigheid van het te analyseren monster overgebracht kan worden naar vector-vrije cellen duidt dit op de aanwezigheid van RCR. Ook bij deze assay wordt vaak eerst amplificatie in *Mus dunni* cellen toegepast.

In de FDA guideline “Supplemental Guidance on Testing for Replication Competent Retrovirus in Retroviral Vector Based Gene Therapy Products and During Follow-up of Patients in Clinical Trials Using Retroviral Vectors” (oktober 2000) wordt het testen op de aanwezigheid van RCR tijdens het productieproces met behulp van biologische assays verplicht gesteld. Hierbij wordt amplificatie in bijvoorbeeld *Mus dunni* cellen voorafgaand aan detectie in bijvoorbeeld de S+/L- assay of de marker rescue assay vereist. Overigens worden deze biologische assays niet aangeraden voor het analyseren van RCR in patiëntenmateriaal. Hiervoor wordt het bepalen van RCR-specifieke antilichamen en de analyse van PBMCs met behulp van een RCR-specifieke PCR geadviseerd (zie hoofdstuk 6).

### **5.3 ELISA**

#### **5.3.1 Achtergrond van de ELISA**

De Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) detecteert eiwitten door middel van specifieke antilichamen. Hiertoe wordt een monoklonaal antilichaam, wat één herkenningspunt op het doelwit heeft, of een polyklonaal antilichaam, wat meerdere herkenningspunten op het doeleiwit heeft, aan een microtiterplaat gebonden. Vervolgens wordt het monster toegevoerd, waarna het doeleiwit indien aanwezig in het monster zal binden aan het antilichaam. Daarna wordt een tweede specifiek antilichaam toegevoegd, waaraan een enzym of een fluorescerend label is gekoppeld, wat ook wel conjugaat wordt genoemd. Dit conjugaat zal binden aan het gebonden doeleiwit. Tenslotte kan het ontstane complex worden aangetoond door middel van een kleurreactie in het geval van een conjugaat met een gekoppeld enzym of door middel van fluorescentie voor een conjugaat met een fluorescerend label. Het grote voordeel van de ELISA is dat dit kan worden toegepast als een gevoelige, kwantitatieve assay door het gebruik van een standaardreeks. Voor toepassing bij shedding analyse, waarmee de ELISA de vector detecteert, is een nadeel dat de ELISA niet vector-specifiek (zie volgende subparagraaf 5.3.2). Uit de literatuur blijkt dat de ELISA bij adenovirale en retrovirale vectoren wordt toegepast voor shedding analyse. Een nadere toelichting hierop volgt hieronder.

#### **5.3.2 ELISA voor adenovirale vectoren**

In een aantal klinische studies met een adenovirale vector is shedding analyse uitgevoerd met behulp van een kwalitatieve ELISA, namelijk de IDEIA™ Adenovirus-test van DakoCytomation Ltd (Ely, United Kingdom) (Palmer, Mautner et al. 2004) of de Adenoclone

EIA van Meridian Diagnostics (Cincinnati, USA) (Schuler, Rochlitz et al. 1998; Dummer, Bergh et al. 2000; Nemunaitis, Swisher et al. 2000; Schuler, Herrmann et al. 2001; Buller, Runnebaum et al. 2002; Kuball, Wen et al. 2002; Lang, Bruner et al. 2003). Deze immunoassays zijn ontwikkeld voor klinische toepassing en bestemd voor het vaststellen van een adenovirale infectie. De testen zijn primair opgezet voor de detectie van alle humane adenovirus-serotypen in humane fecesmonsters en celkweken.<sup>1</sup> Het monoklonaal antilichaam dat gebruikt wordt is genusspecifiek en gericht tegen een epitoom op het hexon-antigeen dat aanwezig is bij alle humane adenovirus serotypen. De IDEIA™ Adenovirus-test heeft een gevoeligheid van  $3 \times 10^5$  virusdeeltjes per ml. Er is geen kruisreactiviteit gevonden met een scala aan virussen, bacteriën en andere micro-organismen.

De specificiteit van deze ELISA's in relatie tot shedding analyse is zeer beperkt te noemen. De testen kunnen niet discrimineren tussen de verschillende serotypes van adenovirus. Daarnaast maken de testen ook geen onderscheid tussen wildtype virus en de vector, omdat het antilichaam gericht is tegen een viraal eiwit dat door beiden tot expressie gebracht worden. De ontwikkeling van een vector-specifieke ELISA behoort hoogstwaarschijnlijk niet tot de mogelijkheden omdat er geen vector-specifieke virale eiwitten tot expressie worden gebracht. Een ELISA gericht tegen het tot expressie gebrachte transgen, wat wel een vector-specifiek eiwit is, is niet geschikt voor shedding analyse. De verspreiding van het tot expressie gebrachte transgen door het lichaam is immers niet per definitie gekoppeld aan verspreiding van de vector.

Ondanks bovengenoemde beperkingen zijn de IDEIA Adenovirus-test en de Adenoclone test wel toegepast in klinische gentherapie studies. Hierbij is in de studies van Palmer en Schuler voor toediening van de adenovirale vector eerst vastgesteld dat monsters van het te behandelen individu negatief voor het adenovirale antigeen waren. Onder deze voorwaarde zou een positief signaal in de test na toediening van de vector toegeschreven kunnen worden aan shedding.

### **5.3.3 ELISA voor retrovirale vectoren**

Bij toepassing van de ELISA voor shedding analyse van retrovirale vectoren wordt niet de vector gemeten, maar antilichamen gericht tegen RCR. Hiertoe wordt een variant van de ELISA toegepast, waarbij de vector wordt gebonden op de microtiterplaat. Dit kan

---

<sup>1</sup> Productinformatie over IDEIA™ Adenovirus-test kan verkregen worden via de website van Dakocytomation, [http://www.dakocytomation.nl/index/prod\\_search/prod\\_products.htm?productareaid=9&baseprodidver=A116910004](http://www.dakocytomation.nl/index/prod_search/prod_products.htm?productareaid=9&baseprodidver=A116910004))

gezuiverde vector zijn (Martineau, Klump et al. 1997) of gezuiverde eiwitten afkomstig van het retrovirus, zoals Gag en Env eiwitten (Kim, Park et al. 2004). Vervolgens wordt de plaat geïncubeerd met serum van de behandelde patiënt, waarna antilichamen gebonden aan de vector kunnen worden aangetoond met een conjugaat specifiek voor humane antilichamen. In de studie van Kim *et al.* wordt gesteld dat het gebruik van gezuiverde eiwitten de voorkeur geniet boven de volledige vector, omdat dit de specificiteit en gevoeligheid ten goede komt. Gag en Env eiwitten zijn immers antigenen die alleen in RCR aanwezig zijn en niet in een replicatie-deficiënte retrovirale vector.

Een nadeel van een ELISA voor anti-RCR antilichamen is het risico van een vals-positief signaal door het feit dat de ELISA geen onderscheid kan maken tussen een afweerreactie tegen de vector of tegen RCR. De antigenen waartegen de afweerreactie gericht is komen immers op beiden voor. Martineau en Kim suggereren daarom dat de ELISA voor RCR shedding analyse het meest geschikt is voor toepassing bij *ex vivo* gentherapie, waarbij de patiënten niet direct blootgesteld worden aan de retrovirale vector (Martineau, Klump et al. 1997; Kim, Park et al. 2004). Een ander aandachtspunt is dat bij patiënten met een verstoord afweersysteem de kans op het verkrijgen van een vals-negatief resultaat bestaat.

In de literatuurstudie (hoofdstuk 2) zijn geen publicaties van klinische retrovirale gentherapie studies gevonden die de ELISA gebruiken voor het analyseren van patiëntenmonsters op RCR. Dit hangt hoogstwaarschijnlijk samen met het feit dat de FDA het bepalen van antilichamen gericht tegen RCR als onderdeel van de patiënten monitoring vrij recent als eis heeft gesteld (zie hoofdstuk 6 voor verdere informatie).

## 6. Richtlijnen door regelgevende instanties

Klinisch genterapie onderzoek wordt in Europa door verschillende regelgevende instanties beoordeeld. De Fase I, II en III klinische studies worden goedgekeurd door nationale regelgevende instanties, zoals in Nederland door de Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek (CCMO) en wanneer bij het onderzoek gebruik gemaakt wordt van een Genetisch Gemodificeerd Organisme (GGO) tevens door het Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieu (VROM). Als het werkingsmechanisme van het genterapeuticum gebaseerd is op een immunologisch principe dient tenslotte de batch vrijgegeven te worden door de Inspectie Gezondheidszorg (IGZ). Registratie van een geneesmiddel geschiedt door het overkoepelende European Medicines Evaluation Agency (EMA). De EU lidstaten werken momenteel aan het harmoniseren van klinisch geneesmiddelenonderzoek binnen Europa. In 2001 is hiervoor de Europese richtlijn Goede Klinische Praktijken 2001/20/EG officieel vastgesteld, welke per 1 maart 2006 in de Nederlandse wetgeving geïmplementeerd wordt. In de Verenigde Staten wordt de regelgeving voor klinisch genterapie onderzoek bepaald door de Food and Drug Administration (FDA), daarbij ondersteund door de National Institutes of Health Office of Biotechnology Activities (NIH-OBA). Deze instanties beoordelen studies op alle niveaus, dus van vroege klinische trials tot registratie. Vertegenwoordigers van de FDA, EMA en de Japanse regelgevende instanties proberen via de International Conference on Harmonisation (ICH) harmonisatie van regelgeving te bereiken.

In dit hoofdstuk wordt een overzicht gegeven van richtlijnen, standpunten en/of adviezen betreffende shedding analyse van diverse zowel overkoepelende als nationale regelgevende instanties. Dit hoofdstuk wordt afgesloten met een bespreking van de ICH richtlijnen voor assay validatie. Deze richtlijnen zijn weliswaar algemeen van aard en van toepassing op vrijgifte assays en karakterisatie van geneesmiddelen, maar blijken in de praktijk als basis gebruikt te worden toegepast door CRO's en farmaceutische bedrijven bij de ontwikkeling van shedding assays (zie hoofdstuk 4).

## 6.1 *Overkoepelende instanties*

### 6.1.1 **European Medicines Evaluation Agency (EMA)**

De EMA ([www.ema.eu.int](http://www.ema.eu.int)) is een gedecentraliseerd orgaan van de Europese Unie en heeft als belangrijkste taak de gezondheid van mens en dier te beschermen en te bevorderen door beoordeling van en toezicht op geneesmiddelen voor menselijk en dierlijk gebruik. In 2001 is de gentherapie richtlijn “Note for Guidance on the quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products” geïmplementeerd. Als reactie hierop heeft de EMA in 2001 de **Gene Therapy Working Party (GTWP)** opgericht die de technische ontwikkelingen volgt in het gentherapie onderzoek en aanbevelingen doet voor het aanpassen of aanvullen van de richtlijnen. De GTWP vergadert een aantal malen per jaar en verslagen van de vergaderingen worden beschikbaar gesteld op de website van de EMA.

#### *Standpunten / adviezen omtrent shedding analyse van de EMA en de GTWP*

De volgende standpunten / adviezen met betrekking tot shedding analyse zijn afkomstig uit de bijeenkomsten van de GTWP en de enige en eerdergenoemde richtlijn van de EMA betreffende gentherapeutica.

- Shedding analyse bij virale vectoren moet verricht worden bij een adequate hoeveelheid patiënten, waarna met deze informatie besloten kan worden door de regelgevende instantie of het voortzetten van de shedding analyse noodzakelijk is.<sup>2</sup>
- Naar aanleiding van een literatuurstudie door het EMA secretariaat naar shedding data bij klinische gentherapie studies met adenovirale vectoren werd geconcludeerd dat slechts enkele studies rapporteren over shedding analyse. Het is te verwachten dat veel informatie over shedding van adenovirale vectoren niet gepubliceerd is en daarmee moeilijk toegankelijk en niet bruikbaar voor het verkrijgen van een compleet overzicht. Daarnaast bestaat tussen de gepubliceerde literatuur weinig overeenkomst in de uitvoering van de studies (verschillende therapeutische indicatie, toedieningswijze, doses, adenovirale detectie methode en tijdstippen van shedding analyse). Door de GTWP is geconcludeerd dat de gepresenteerde data niet voldoende waren om hiermee de klinische relevantie en veiligheidsimplicaties van vector shedding te evalueren. Daarnaast zijn gevalideerde assays noodzakelijk voor het verrichten van adenovirale vector shedding studies.<sup>3</sup>

---

<sup>2</sup> “Note for guidance on the quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products” (<http://www.ema.eu.int/pdfs/human/bwp/308899en.pdf>)

<sup>3</sup> Report GTWP 11 februari 2002, [www.ema.eu.int/htms/human/genetherapy/genetherapy.htm](http://www.ema.eu.int/htms/human/genetherapy/genetherapy.htm)

- Voor het detecteren en kwantificeren van retrovirussen wordt het meest frequent gebruik gemaakt van een kwantitatieve PCR. Voor validatie van dit type assay moet de lineariteit, detectiegrens, nauwkeurigheid, accuraatheid, kwantificeringsgrens en het bereik bepaald worden.<sup>4</sup> Deze assay karakteristieken zijn in detail uitgewerkt in paragraaf 6.3.

Uit een interview met Hans Ovelgönne, bij het RIVM betrokken bij de farmaceutische beoordeling van geneesmiddelen voor het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen en lid van de hierboven beschreven EMEA GTWP, is naar voren gekomen dat de EMEA ook milieurisico beoordelingen gaat verrichten bij de vergunningverlening van geneesmiddelen, inclusief genterapeutica.<sup>5</sup> Het is nog onduidelijk of de beoordelingen van milieurisico's openbaar gemaakt zullen worden.

### **6.1.2 International Conference on Harmonisation (ICH)**

De ICH is opgericht door regelgevende instanties en de industrie uit Europa, Japan en de Verenigde Staten met als doel het opstellen van aanbevelingen om harmonisatie te bewerkstelligen in de interpretatie en implementatie van technische richtlijnen en eisen die gesteld worden aan product registratie.

Binnen de ICH is in juli 2000 de **Gene Therapy Discussion Group (GTDG)** gevormd, welke specifieke aanbevelingen op het gebied van genterapie doet. Dit was volgens de ICH noodzakelijk vanwege een snelle toename van genterapieproducten. De GTDG richt zich op diverse aspecten van genterapie, inclusief shedding, en organiseert regelmatig publieke workshops. De GTDG heeft niet als doel om richtlijnen te ontwikkelen, maar overwogen wordt of in de toekomst "consensus principles; regarding Gene Therapy safety issues" ontwikkeld gaan worden (Simek 2003). Samenvattingen van de discussies die gevoerd zijn bij de bijeenkomsten van de ICH GTDG zijn openbaar en terug te vinden op de website van de ICH ([www.ich.org](http://www.ich.org)). Relevante aanbevelingen / standpunten op het gebied van shedding vanuit de GTDG worden hieronder behandeld.

#### *Standpunten / adviezen omtrent shedding analyse van de GTDG*

In totaal zijn tot op heden vier bijeenkomsten georganiseerd waarbij uiteenlopende onderwerpen zijn besproken, zoals kiemceltransmissie (zie hoofdstuk 7), het detecteren van replicatie competente virussen, insertiemutagenese en oncogenese bij retrovirussen en nieuw

<sup>4</sup> Report GTWP 11 februari 2002, [www.emea.eu.int/htms/human/genetherapy/genetherapy.htm](http://www.emea.eu.int/htms/human/genetherapy/genetherapy.htm)

<sup>5</sup> [http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/vol-1/DIR\\_2003\\_63/DIR\\_2003\\_63\\_NL.pdf](http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/vol-1/DIR_2003_63/DIR_2003_63_NL.pdf)



ontwikkelde virussen. Wat betreft shedding heeft de GTDG in 2002 aanbevolen het verzamelen van adenovirus shedding data door te zetten.<sup>6</sup> De tot dan toe verzamelde shedding data van adenovirus gaven op dat moment geen aanleiding voor een specifiek veiligheidspunt.

## **6.2 Nationale instanties**

### **6.2.1 Verenigde Staten: Food and Drug Administration (FDA) en National Institutes of Health (NIH)**

De Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) van de FDA is in de Verenigde Staten verantwoordelijk voor het goedkeuren van gentherapeutica. Voor het goedkeuren is eveneens toestemming vereist van de Office of Biotechnology Activities (OBA, [www4.od.nih.gov/oba/](http://www4.od.nih.gov/oba/)) van de NIH, welke wordt geadviseerd door de Recombinant DNA Advisory Committee (RAC, [www4.od.nih.gov/oba/Rdna.htm](http://www4.od.nih.gov/oba/Rdna.htm)).

#### *Standpunten / adviezen omtrent shedding analyse van de FDA<sup>7</sup>*

De FDA heeft geen officiële documenten met richtlijnen voor shedding analyse. Wel heeft de FDA als standpunt dat shedding data voor specifieke vectoren, toedieningswijzen of indicaties verzameld moeten worden voordat een gentherapie product geregistreerd kan worden. Tot op heden is voor retrovirussen en AAV vectoren wel als verplichting opgelegd dat bij intraveneuze toediening shedding analyse van semen wordt uitgevoerd. Voor adenovirale vectoren kan de FDA besluiten dat voor een Fase I studie shedding analyse niet noodzakelijk is indien shedding data uit eerdere studies met dezelfde vector en toedieningswijze beschikbaar zijn die geen aanleiding voor bezorgdheid geven. Voor registratie van een adenoviraal gentherapeuticum wordt van de uitvoerders verwacht dat zij shedding data verzamelen in alle latere fasen van hun studies.

Voor adenovirale en ALVAC vectoren wordt in het algemeen een kwantitatieve PCR of een biologische assay (plaque assay of cytopathisch effect) toegepast bij shedding analyse. Vanwege praktische redenen wordt voor retrovirale en AAV vectoren vaak alleen PCR gebruikt. Gevoeligheid en vector-specificiteit zijn belangrijke karakteristieken waarop gelet wordt. De FDA beoordeelt de kwaliteit van een shedding assay aan de hand van de Standard Operating Procedure, waarin negatieve en positieve controles opgenomen moeten zijn en een spiking monster teneinde te testen voor inhibitie. Voor vroege-fase klinische studies worden

---

<sup>6</sup> <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>

<sup>7</sup> Alle FDA richtlijnen verkrijgbaar via <http://www.fda.gov/cber/genetherapy/gtpubs.htm>

geen gevalideerde testen verwacht, maar wel een bepaalde mate van kwalificatie. De FDA heeft overigens in de praktijk ervaren dat afname, codering en opslag van monsters in diverse studies niet op adequate wijze is uitgevoerd waardoor de shedding data niet goed geïnterpreteerd konden worden.

De FDA beschikt alleen voor adenovirale vectoren over een groot aantal shedding data. Voor dit type vector is shedding waargenomen in feces, urine, speeksel en monsters afgenomen uit de luchtwegen. De FDA beschouwt verspreiding van de vector naar het bloed na lokale toediening overigens niet als shedding. Een interessante observatie is dat shedding lijkt af te nemen bij herhaaldelijke toediening van een adenovirale vector. Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat de farmacokinetiek van de adenovirale vector in de loop van de tijd verandert door het ontstaan van antilichamen tegen de vector. Tot op heden is geen overdracht van een adenovirale vector naar derden in de omgeving van de patiënt waargenomen. *(gebaseerd op informatie van Dr. Maritza McIntyre en Dr. Andrew Byrnes, Division of Cellular and Gene Therapies, FDA)*

In de “Guidance for Industry: supplemental guidance on testing for RCR in retroviral vector based gene therapy products and during follow-up of patients in clinical trials using retroviral vectors, October 2000” wordt het actief monitoren van RCR infectie bij patiënten die deelnemen aan klinische genterapie studies met retrovirale vectoren aanbevolen. Als aanbevolen testschema geldt: voor behandeling, 3, 6 en 12 maanden na behandeling en daarna jaarlijks gedurende het gehele leven. Dit schema is geldig als de monsters na behandeling negatief blijven. Als een monster positief voor RCR blijkt, moet verdere analyse van dit monster plaatsvinden en is een intensieve follow-up van de patiënt noodzakelijk. Door de FDA worden de volgende 2 methoden voor RCR analyse aanbevolen: (1) de detectie van RCR-specifieke antilichamen of (2) analyse van PBMCs met PCR voor RCR-specifieke DNA sequenties. Aangezien bekend is dat bij directe toediening van een retrovirale vector of vector-producerende cellen vector-specifieke antilichamen kunnen ontstaan die niet correleren met de aanwezigheid van RCR, heeft in dergelijke studies de PCR de voorkeur. Bij een positieve uitslag in bovenstaande methoden dient een viruskweek gekarakteriseerd te worden.

### **6.2.2 China**

In China is in 2003 als eerste land ter wereld een genterapeuticum goedgekeurd. Het betreft Gendicine, een niet-replicerende adenovirale vector dat het humane p53 gen tot expressie

brengt en dat nu toegepast mag worden als behandeling van hoofd/hals kanker. Inmiddels zijn meer dan 2500 patiënten behandeld zonder ernstige bijwerkingen. Onlangs is een publicatie verschenen over de huidige status van Gendicine (Peng 2005). In deze publicatie is geen informatie opgenomen over shedding analyse. Daarom is contact gezocht met de producent van Gendicine, Shenzhen SiBiono GeneTech (SiBiono, Shenzhen, China, [www.sibiono.com](http://www.sibiono.com)). De Chief Executive Officer van Sibiono, Dr. Zhaohui Peng, heeft echter aangegeven in dit stadium geen nadere informatie over shedding analyse en shedding data te kunnen verstrekken. De verwachting is dat deze gegevens later gepubliceerd zullen worden.

Gendicine is goedgekeurd door het Chinese State Food and Drug Administration (SFDA, [www.sfda.gov.cn](http://www.sfda.gov.cn)). In 2003 heeft de SFDA in samenwerking met SiBiono een document met “Points to Consider for Human Gene Therapy and Product Quality Control” opgesteld.<sup>8</sup> Dit document wordt nu door de SFDA als richtlijn gehanteerd voor de ontwikkeling van een genterapeuticum. Er worden diverse vereisten beschreven met betrekking tot kwaliteitscontrole en de evaluatie van de veiligheid en effectiviteit van een genterapeuticum. Er wordt echter geen melding gemaakt over analyse van shedding in (pre)klinische studies. Wel wordt gesteld dat een replicatie-deficiënte adenovirale vector batch niet meer dan 1 RCA per  $3 \times 10^{10}$  virusdeeltjes mag bevatten, bepaald met een A549 viruskweek. Verder wordt het belang van het testen van een retrovirale vector batch op de aanwezigheid van RCR benadrukt en worden er richtlijnen gegeven voor deze kwaliteitscontrole test. Er worden echter geen specificaties gesteld voor een acceptabele hoeveelheid RCR.

### **6.2.3 Engeland**

Klinische genterapie studies worden in Engeland uitgevoerd volgens de Genetically Modified Organisms (Contained Use) Regulations 2000, in Nederland de Ingeperkt Gebruik regelgeving genoemd. Ingeperkt Gebruik betekent dat verspreiding van het genetisch gemodificeerd organisme (ggo) in het milieu voorkomen wordt door middel van verschillende voorzorgsmaatregelen, inclusief fysieke, chemische en biologische barrières. Indien de mogelijkheid van shedding bestaat, kan echter niet aan deze Ingeperkt Gebruik regelgeving worden voldaan. In dat geval zou de Genetically Modified Organisms (Deliberate Release) Regulations 2002, in Nederland de Introductie in het milieu regelgeving genoemd, van toepassing zijn. Om hier meer duidelijkheid in te scheppen zijn de Health and

---

<sup>8</sup> <http://www.sibiono.com/UploadFile/Points-China.pdf>

Safety Executive (HSE) en de Department for the Environment, Food and Rural Affairs (Defra) momenteel in samenwerking met de Scientific Advisory Committee on Genetic Modification (SACGM) een richtlijn aan het voorbereiden over het gebruik van ggo's in een klinische studie. In deze richtlijn zal vastgelegd worden waaraan de risicoanalyses, inclusief die voor het milieu, moeten voldoen. De eisen voor shedding analyse zullen afhangen of de klinische genterapie studie uitgevoerd wordt volgens de Contained Use Regulations of volgens de Deliberate Release Regulations. Dit onderscheid zal bepaald worden door het wel of niet opzettelijk introduceren van het ggo in het milieu, de veiligheidsklasse van het ggo, en biologische beperkingen zoals het vermogen tot infecteren en repliceren. Zo wordt een vaccinatie studie met een bacterieel pathogeen beschouwd als een Deliberate Release studie, en een genterapie studie waarbij gebruik wordt gemaakt van een replicatie-deficiënte vector als een Contained Use studie, ook al is de kans aanwezig dat shedding optreedt. Voor studies die volgens de Deliberate Release Regulations worden uitgevoerd zal monitoring van shedding verplicht worden gesteld. De opzet van deze shedding monitoring zal daarbij afhangen van het type ggo. Voor studies die volgens de Contained Use Regulations worden uitgevoerd zijn een risicoanalyse alsmede geschikte veiligheidsmaatregelen voldoende. Er wordt wel geadviseerd om in Fase I studies zoveel mogelijk informatie te verzamelen over shedding van het ggo. De keuze van het type shedding assay wordt aan de onderzoeker overgelaten. Wel wordt opgemerkt dat door middel van een PCR geen uitspraken gedaan kunnen worden over de aanwezigheid van infectieuze virale ggo's. Op basis van een toename of afname van het aantal genomen van het ggo bepaald met een kwantitatieve PCR zou vastgesteld kunnen worden of er wel of geen replicatie plaatsvindt. Shedding assays gebaseerd op moleculaire detectie van het ggo dienen gevalideerd te zijn.

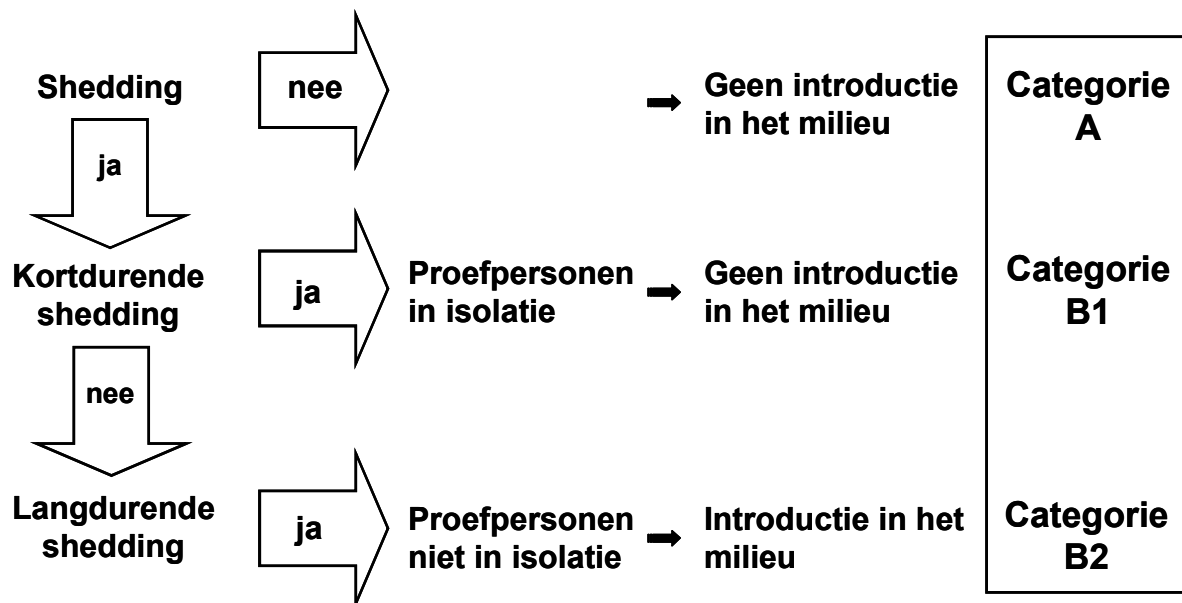
*(gebaseerd op informatie van Dr. Paul Logan, Health and Safety Executive, Engeland)*

#### **6.2.4 Zwitserland**

In Zwitserland wordt momenteel door het Zwitserse agentschap voor geneesmiddelen (Swissmedic, [www.swissmedic.ch](http://www.swissmedic.ch)) met een aantal andere Zwitserse regelgevende instanties een richtlijn opgesteld voor de milieurisicoanalyse die een onderzoeker moet uitvoeren bij het indienen van een vergunningsvraag voor een klinische genterapie studie. In de huidige conceptversie van deze toekomstige richtlijn wordt gesteld dat alleen voor de periode na toediening van de vector een milieurisicoanalyse opgesteld dient te worden, omdat het risico van verspreiding van de vector in het milieu in die fase het grootst is. De onderzoeker dient op voorhand in te schatten of, en zo ja hoe lang, shedding zal optreden. Vervolgens kan aan

de hand van een beslisboom bepaald worden aan welke eisen de milieurisicoanalyse moet voldoen. In de beslisboom wordt hierbij onderscheid gemaakt in drie categorieën van shedding (Figuur 1).

**Figuur 1. Beslisboom in de conceptversie van de Zwitserse richtlijn omtrent milieurisicoanalyse bij klinische genterapie studies.**



*Met goedkeuring overgenomen uit de presentatie van Dr. Andreas Marti (Head Gene Therapy Clinical Trials and Products, Swissmedic) en Dr. Ursula Jenal (Jenal & Partners Biosafety Consulting, Basel, Zwitserland) gegeven tijdens de EMEA Gene Therapy Working Group vergadering op 20 januari 2006 in Londen.*

Voor elk van de drie categorieën wordt in de concept richtlijn aangegeven welke gegevens en maatregelen vereist worden. Dit kan als volgt worden samengevat:

- Categorie A:
  - gegevens over biodistributie en shedding uit preklinische studies en klinische studies met een vergelijkbaar product
  - risicoanalyse teneinde het ontbreken van shedding te bevestigen
  - veiligheidsmaatregelen teneinde verspreiding van de vector of besmet materiaal in het milieu te voorkomen
- Categorie B1:

- gegevens over isolatie van de proefpersonen met betrekking tot behandeling van excreta, methoden waarmee isolement wordt opgeheven en indien van toepassing status van immuniteit van derden met betrekking tot het uitgescheiden product
- risicoanalyse inzake derden die in contact kunnen komen met het uitgescheiden product
- veiligheidsmaatregelen teneinde verspreiding van de vector of besmet materiaal in het milieu of besmetting van derden te voorkomen
- Categorie B2:
  - gedetailleerde gegevens over de vector welke relevant zijn voor de risicoanalyse
  - gedetailleerde risicoanalyse voor derden en het milieu
  - gedetailleerde beschrijving van veiligheidsmaatregelen teneinde derden en het milieu te beschermen tegen het uitgescheiden product, inclusief shedding monitoring en gegevens over de gevoeligheid en betrouwbaarheid van de shedding assays

Het is niet bekend wanneer deze concept richtlijn definitief en geïmplementeerd zal worden. *(gebaseerd op informatie van Dr. Andreas Marti (Head Gene Therapy Clinical Trials and Products, Swissmedic) en Dr. Ursula Jenal (Jenal & Partners Biosafety Consulting, Basel, Zwitserland))*

### **6.2.5 Overige landen**

In Japan wordt bij de beoordeling van klinische gentherapie studies onderscheid gemaakt tussen studies aangevraagd door farmaceutische bedrijven en studies aangevraagd door (academische) onderzoeksinstituten. Alle aanvragen voor klinische gentherapie studies worden ingediend bij de Ministry of Health, Labor and Welfare ([www.mhlw.go.jp/english](http://www.mhlw.go.jp/english)). Gentherapie aanvragen ingediend door onderzoeksinstituten worden beoordeeld door de Health Science Council (HSC), waarbij gebruik wordt gemaakt van de “Guideline for Gene Therapy Clinical Research” van het MHLW. Gentherapie aanvragen ingediend door farmaceutische bedrijven worden beoordeeld door de Pharmaceutical Affairs and Food Safety Council (PAFSC), waarbij gebruik wordt gemaakt van de “Guidelines for Assuring the Quality and Safety of Gene Therapy Products”. Deze richtlijnen zijn alleen verkrijgbaar in het Japans en geven geen adviezen omtrent shedding analyse *(gebaseerd op interview met Prof. dr. Y. Nasu, Department of Urology, Universiteit van Okayama, Japan)*.

In Zweden zijn tot op heden geen regelgevende richtlijnen omtrent shedding analyse bij klinische gentherapie studies opgesteld *(gebaseerd op informatie van Prof. dr. Thomas Tötterman, Clinical Immunology Division, Universiteit van Uppsala, Zweden)*. Dit geldt ook

voor Duitsland (*gebaseerd op informatie van Prof. dr. Klaus Cichutek, Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Duitsland*). Het is niet bekend of Frankrijk en Engeland beschikken over dergelijke richtlijnen. In Nederland zijn eveneens geen richtlijnen voor shedding analyse, alhoewel milieu risicoanalyse wel onderdeel vormen van de beoordeling van een klinische gentherapie studie aanvraag door het ministerie van VROM. De CCMO acht de kans op verspreiding in het milieu van de tot nu gebruikte virale vectoren in de beoordeelde studies in Nederland nihil (*gebaseerd op vragenlijst ingevuld door Dr. Marcel Kenter, secretaris van de CCMO*). Vanuit de Nederlandse Vereniging voor Gentherapie (NVGT) zijn nog geen officiële standpunten ingenomen over gentherapie onderwerpen (*gebaseerd op een interview met Prof. dr. Hidde Haisma, voorzitter van de NVGT*).

### **6.3 Algemene ICH richtlijnen voor assay validatie**

Uit de contacten met CRO's en farmaceutische bedrijven die betrokken zijn (geweest) bij klinische gentherapie studies is gebleken dat de Q2A en Q2B richtlijnen van de ICH voor assay validatie veelvuldig worden toegepast bij de ontwikkeling van shedding assays. Deze Q2A en Q2B richtlijnen worden hier verder uitgewerkt als voorbeeld van een mogelijke benadering voor gestandaardiseerde shedding assay ontwikkeling.

De FDA eist dat bij Fase III klinische studies assays worden toegepast welke gevalideerd zijn volgens de ICH Q2A en Q2B richtlijnen (mogelijk gaat dit binnenkort ook gelden voor Fase II studies). Richtlijn Q2A "Text on validation of analytical procedures" (1994, verkrijgbaar via [www.ich.org](http://www.ich.org) onder "Guidelines") geeft een overzicht van assay karakteristieken welke gebruikt kunnen worden bij de validatie van analytische assays. Tevens worden de karakteristieken gedefinieerd om zo de verschillen in begrip te overbruggen die bestaan tussen de regelgevende instanties van Europa, Japan en de Verenigde Staten. De analytische testen waarop deze richtlijn betrekking heeft, worden onderverdeeld in de volgende vier categorieën:

1. kwantitatieve testen voor de bepaling van de actieve component
2. kwantitatieve testen voor de bepaling van onzuiverheden
3. limiettesten voor de bepaling van onzuiverheden
4. identificatietesten

In de richtlijn Q2B "Validation of analytical procedures: Methodology" worden suggesties en aanbevelingen gedaan voor de uitvoering van de validatie van de vier categorieën analytische assays. In Tabel 6.1 worden de validatie karakteristieken en de methode van validatie samengevat voor deze vier analytische assay categorieën.

**Tabel 6.1: Validatie karakteristieken per assay categorie volgens de ICH Q2A en Q2B richtlijnen**

Karakteristiek	Beschrijving	Methode van validatie	Identificatie assay	Bepaling van onzuiverheden		Kwantitatieve assay actieve component
				Kwantitatief	Limiet	
<b>Accuraatheid</b>	Afwijking tussen werkelijke waarde en de gevonden waarde	Minimaal 3 hoeveelheden binnen assay bereik in 3-voud meten; uitgedrukt als percentage opbrengst	-	+	-	+
<b>Nauwkeurigheid</b>	Mate van overeenkomst tussen verschillende metingen van hetzelfde monster uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden <sup>1</sup>	Minimaal 3 hoeveelheden binnen assay bereik in 3-voud meten; uitgedrukt als relatieve standaarddeviatie (coefficient of variation).	-	+	-	+
<b>Specificiteit</b>	Vermogen om eenduidig de component van interesse te bepalen in aanwezigheid van andere componenten aanwezig in het monster	Identificatie assay: - Positief resultaat in monster met component versus negatief resultaat in monster zonder component Overige assays: - Component toevoegen (“spiken”) aan onzuiverheden of andere componenten die in overmaat in het monster aanwezig zijn - Vergelijken van twee onafhankelijke assays indien onzuiverheden of andere componenten die in overmaat in het monster aanwezig zijn niet beschikbaar zijn	+	+	+	+
<b>Detectiegrens</b>	Laagste hoeveelheid component dat niet-kwantitatief gedetecteerd kan worden in een monster	Verschillende benaderingen: - signaal/ruis verhouding - gebaseerd op de standaarddeviatie van de blanco - gebaseerd op de ijklijn	-	+/-	+	-
<b>Kwantificeringsgrens</b>	Laagste hoeveelheid component dat kwantitatief gedetecteerd kan worden in een monster met acceptabele accuraatheid en nauwkeurigheid	Verschillende benaderingen: - signaal/ruis verhouding - gebaseerd op de standaarddeviatie van de blanco - gebaseerd op de ijklijn Accuraatheid en nauwkeurigheid dienen vastgesteld te worden.	-	+	-	-
<b>Lineariteit</b>	Vermogen om resultaten te verkrijgen die direct proportioneel zijn aan de component concentratie in het monster	Statistische analyse van het lineaire verband tussen de uitkomst en de component concentratie (bijv. lineaire regressie met kleinste kwadratenmethode); uitgedrukt als correlatiecoëfficiënt, y-intercept, helling en residue som van de kwadraten	-	+	-	+
<b>Bereik</b>	Interval tussen laagste en hoogste component concentratie waarbij accuraatheid, nauwkeurigheid en lineariteit acceptabel zijn	Afgeleid van lineariteit resultaten en gebaseerd op ijklijn; uitgedrukt als percentage afwijking tussen daadwerkelijke hoeveelheid en gemeten hoeveelheid waarbij 80-120% afwijking acceptabel is	-	+	-	+

<sup>1</sup> Nauwkeurigheid wordt onderverdeeld in herhaalbaarheid (nauwkeurigheid binnen een assay), intermediaire nauwkeurigheid (nauwkeurigheid binnen een laboratorium) en reproduceerbaarheid (nauwkeurigheid tussen laboratoria). In deze tabel wordt de herhaalbaarheid beschreven. Voor een beschrijving van intermediaire nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid wordt verwezen naar de ICH Q2A en Q2B richtlijnen ([www.ich.org](http://www.ich.org)).



### *Mogelijke toepassing van ICH Q2A en Q2B richtlijnen bij de ontwikkeling van shedding assays*

Eerder in dit rapport is vastgesteld dat PCR, viruskweek en in mindere mate ELISA de meest toegepaste methoden zijn voor shedding analyse. Indien deze methoden kwantitatief worden toegepast, kunnen ze geplaatst worden in de ICH assay categorie “kwantitatieve testen voor de bepaling van onzuiverheden”. De niet-kwantitatieve varianten passen in de ICH assay categorie “limiettesten voor de bepaling van onzuiverheden”. Uit Tabel 6.1 kan afgeleid worden welke karakteristieken belangrijk zijn voor deze twee assay categorieën. Voor een kwantitatieve shedding assay zijn de accuraatheid, nauwkeurigheid, specificiteit, kwantificeringsgrens, lineariteit en bereik belangrijke karakteristieken. Voor een kwalitatieve shedding assay zijn dit de specificiteit en de detectiegrens. In Tabel 6.1 wordt beschreven op welke wijze deze karakteristieken gevalideerd kunnen worden. Hieronder wordt een aantal aanvullingen gegeven die specifiek van toepassing zijn op shedding assays voor virale vectoren.

#### Specificiteit

De specificiteit van de shedding assay is van groot belang. Een vals-negatief of een vals-positief resultaat binnen een klinische studie kan immers verstrekende gevolgen hebben. Zoals beschreven in hoofdstuk 5, is de specificiteit van de PCR sterk afhankelijk van de primers. Een PCR is vector-specifiek indien de primers specifiek zijn voor DNA sequenties die uniek zijn voor de vector en niet voorkomen in wildtype virus. Bij de selectie van primers moet daarom aandacht besteed worden aan de lengte en basen-samenstelling van de primers, en de grootte van het amplicon (zie hoofdstuk 5 voor details). Daarnaast moet de PCR kunnen discrimineren tussen viraal DNA en andere nucleïnezuren die van nature in een humaan monster voorkomen. Om de specificiteit van een PCR te bestuderen kan bijvoorbeeld het resultaat van een negatieve controle (bijvoorbeeld een lichaamsvloeistof van een onbehandelde persoon) vergeleken worden met een positieve controle (hetzelfde type lichaamsvloeistof van dezelfde persoon waaraan een bekende hoeveelheid virale vector is toegevoegd) (Wang, Patel et al. 2003).

Bij een viruskweek voor niet-replicerende adenovirale vectoren worden vaak twee typen cellijnen gebruikt welke kunnen discrimineren tussen wildtype virus en de vector. Voor niet-replicerende Ad vectoren zijn dit bijvoorbeeld de humane embryogene 293-niercellijn, getransfecteerd met het E1-domein waarin zowel wildtype Ad als een niet-replicerende Ad vector kan repliceren (Graham, Smiley et al. 1977), en de humane longkanker A549-celijn,

waarin alleen wildtype Ad kan repliceren (Imler, Chartier et al. 1996). Door gelijktijdig kweken van monsters op beide cellijnen kan aanwezigheid van de vector aangetoond of uitgesloten worden. Bevestiging van een positieve viruskweek met bijvoorbeeld PCR verhoogt de specificiteit. Een combinatie van assays wordt ook in de ICH richtlijn Q2B aangeraden indien een enkele assay niet 100% specifiek is.

Voor adenovirale vectoren wordt op beperkte schaal ook een ELISA toegepast. Zoals reeds beschreven in hoofdstuk 5 is een dergelijke ELISA niet specifiek voor een adenovirale vector en is het hoogstwaarschijnlijk niet mogelijk om een vector-specifieke ELISA te ontwikkelen.

#### Kwantificeringsgrens & detectiegrens

De FDA heeft een aanbeveling gedaan voor de gevoeligheid, waarmee de detectiegrens en kwantificeringsgrens samenhangt, van een kwantitatieve PCR. Deze richtlijn stelt dat de gevoeligheid van een kwantitatieve PCR bepaald moet worden in de aanwezigheid van genomisch DNA, waarbij een gevoeligheid van < 100 kopieën/μg genomisch DNA wordt aanbevolen (Gonin and Gaillard 2004).

## 7. Kiemceltransmissie

Kiemceltransmissie is een vorm van shedding waarbij de vector terecht komt in de voortplantingsorganen resulterend in het doorgeven van het therapeutisch gen aan het nageslacht. Dit is een ongewenst en ethisch onacceptabel neveneffect van gentherapie. In dit hoofdstuk worden gegevens uit de preklinische en klinische literatuur en richtlijnen van regelgevende instanties betreffende kiemceltransmissie behandeld.

### 7.1 *Kiemceltransmissie in preklinische studies*

In de literatuur wordt kiemceltransmissie voornamelijk bestudeerd in preklinische studies met adenovirale of AAV vectoren. In proefdieren is waargenomen dat bij intraveneuze of lokale toediening van een adenovirale vector biodistributie naar de geslachtsorganen kan optreden (Gonin and Gaillard 2004). Er zijn diverse studies waarbij gekeken is of deze biodistributie resulteert in kiemceltransmissie. In de studie van Ye *et al.*, waarbij muizen een hoge dosis replicatie-deficiënte adenovirale vector ( $5 \times 10^{10}$ VP) intraveneus kregen toegediend, werd 29 dagen na toediening viraal DNA door middel van PCR waargenomen in mannelijke en vrouwelijke geslachtsorganen, maar niet meer op latere tijdstippen (Ye, Gao et al. 1998). Ondanks het voorkomen van viraal DNA in de geslachtsorganen ten tijde van de voortplanting (dag 26) werd in 578 nakomelingen waarvan 1 of beide ouders de vector kregen toegediend geen kiemceltransmissie waargenomen. Bij toediening van een replicatie-deficiënte adenovirale vector in de linker hartventrikel van muizen werd de aanwezigheid van viraal DNA waargenomen in de testes na 4 dagen, maar niet in testiculaire spermatoïden en epididymaal sperma (Peters, Drumm et al. 2001). Paielli *et al.* hebben na toediening van een replicatie-competente adenovirale vector in de prostaat van muizen virus aangetoond in de testes van alle mannetjes op dag 8 en dag 29 na toediening (Paielli, Wing et al. 2000). In de 149 nakomelingen werden echter geen aanwijzingen gevonden voor kiemceltransmissie. Directe toediening van een replicatie-deficiënt adenovirale vector in de ovaria van muizen resulteerde evenmin in de verspreiding van de vector naar de oöcyten noch in kiemceltransmissie in de 202 nakomelingen (Gordon 2001). Daarnaast werd na directe blootstelling van oöcyten aan de vector geen opname van de vector waargenomen.

Ook voor AAV vectoren is biodistributie naar de geslachtsorganen in geobserveerd (Gonin and Gaillard 2004). In een uitgebreide studie waarbij een AAV vector intramusculair of intraveneus werd toegediend in muizen, ratten, konijnen of honden werd verspreiding van

de vector naar de geslachtsorganen gevonden (Arruda, Fields et al. 2001). De vector werd echter niet aangetroffen in semen, waardoor kiemceltransmissie in mannetjes niet zal optreden. Toediening van een AAV vector in de hartspier van ratten resulteerde niet in de transductie van spermatoïden of mature spermacellen (Pachori, Melo et al. 2004). Ook directe blootstelling van spermacellen aan hoge concentraties AAV leidt niet tot detectie van vector materiaal in 102 nakomelingen (Couto, Parker et al. 2004).

Deze bevindingen geven aan dat het optreden van kiemceltransmissie door adenovirale en AAV vectoren in preklinische studies onwaarschijnlijk is.

## **7.2 Kiemceltransmissie in gepubliceerde klinische genterapie studies**

In de literatuurstudie beschreven in hoofdstuk 2 zijn zes publicaties gevonden die rapporteren over analyse van shedding in semen of gonadaal weefsel. In twee gevallen werd hierbij melding gemaakt van positieve shedding resultaten. In een studie waarbij hemofilie patiënten intraveneus behandeld werden met een retrovirale vector werd semen analyse uitgevoerd in week 2, 6, 9, 11, 17, 29 en 53 na toediening van de vector (Powell, Ragni et al. 2003). In week 9 bleek 1 monster van een 10-voudige analyse positief voor vector DNA (geschatte transductiefrequentie 1 op  $3 \times 10^6$ ), terwijl nadien alle semen monsters afgenomen van dezelfde patiënt negatief bleven. In de studie van Herman, waarbij patiënten met prostaatkanker behandeld werden met een intratumorale injectie van een replicatie-deficiënte adenovirale vector coderend voor thymidine kinase, kon van slechts één patiënt semen verzameld worden op dag 14 (Herman, Adler et al. 1999). Dit semen monster bleek in een PCR positief te zijn voor vector DNA. In de publicatie wordt niet nader ingegaan op deze bevinding.

In de drie andere publicaties werd geen shedding in semen waargenomen. In een Fase I/II en een Fase III studie met retrovirale genterapie voor glioblastoma werd in monsters van gonadaal weefsel verkregen na obductie van in totaal 26 patiënten (15 mannen en 11 vrouwen) geen vector DNA waargenomen (Shand, Weber et al. 1999; Rainov 2000). Na intracoronaire toediening van een replicatie-deficiënte adenovirale vector voor stabiele angina pectoris werd 8 weken na toediening eveneens geen vector DNA gevonden in semen monsters van 12 patiënten (Grines, Watkins et al. 2002). Ook in een AAV studie, waarbij de vector intramusculair werd toegediend in hemofilie patiënten (Kay, Manno et al. 2000) waren semen monsters verzameld op dag 48, 56 of 59 na toediening negatief voor vector DNA.

Samenvattend kan gesteld worden dat gegevens uit de literatuur wijzen op de mogelijkheid van biodistributie naar de geslachtsorganen kan optreden, met shedding naar

semen als gevolg. Het risico dat dit resulteert in kiemceltransmissie wordt in klinische genterapie studies geminimaliseerd door het gebruik van anticonceptiemiddelen voor te schrijven.

### **7.3 Kiemceltransmissie in Nederlandse klinische genterapie studies**

Er zijn geen historische gegevens gevonden over shedding analyse in semen in de Nederlandse genterapie studies. Wel is in de in subparagraaf 7.2 beschreven multicenter Fase I/II studie en Fase III studie met intratumorale toediening van een retrovirale vector, waaraan twee Nederlandse centra hebben geparticipeerd (zie hoofdstuk 3, subparagraaf 3.1), gonadaal weefsel van 26 patiënten bestudeerd. Hierbij is geen verspreiding van de vector naar de geslachtsorganen waargenomen. Momenteel loopt er één studie waarbij shedding gemeten wordt in semen, namelijk studie BGGO 05-001 (zie hoofdstuk 3 en bijlage 9.6). In deze studie worden patiënten met een deficiëntie voor lipoproteïne lipase behandeld met een intramusculaire toediening van AMT-010, een AAV vector coderend voor lipoproteïne lipase variant S447X. Uit de ontwerpbeschikking van het Ministerie van VROM blijkt dat tijdens deze studie shedding wordt geanalyseerd in semen bij mannelijke patiënten. De analyse van vector DNA door middel van PCR wordt gecontinueerd totdat monsters driemaal negatief zijn na een volledige cyclus van de spermatogenese, i.e. 75 dagen. Daarnaast dienen mannelijke patiënten gedurende deze periode gebruik te maken van fysieke contraceptie.

### **7.4 Richtlijnen van regelgevende instanties omtrent kiemceltransmissie**

#### *FDA en NIH*

De FDA en NIH hebben tot op heden geen specifieke richtlijnen omtrent kiemceltransmissie opgesteld. Kiemceltransmissie is wel een onderwerp dat regelmatig tijdens bijeenkomsten van de FDA aan de orde komt. Zo is tijdens de vergadering van de FDA Biological Response Modifiers Advisory Committee in 2002 (<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/cber02.htm>) overeengekomen dat een positief testresultaat in semen geen aanleiding is voor het stopzetten van een klinische studie. Deze beslissing werd genomen naar aanleiding van positieve testresultaten gedurende tenminste 12 weken van semen van twee patiënten met hemofilie B die behandeld werden met een AAV vector coderend voor factor IX in de Avigen studie. Technisch is het lastig om semen te fractioneren en een zuivere fractie te verkrijgen. Indien semen monsters langer dan een jaar positief blijven, is dit voor de FDA aanleiding om na te gaan of er daadwerkelijk kiemceltransmissie is opgetreden. In dat geval dienen studies

stopgezet te worden totdat kan worden uitgesloten dat genomische integratie is opgetreden. Als kiemceltransmissie wordt gevonden, gaan ethische vraagstukken als het preventief voorkomen van voortplanting een rol spelen. Bovengenoemde commissie erkent dat vrouwelijke proefpersonen niet getest kunnen worden op kiemceltransmissie omdat er geen niet-invasieve methoden bestaan voor het afnemen van kiemcelmonsters.

### *EMEA*

De EMEA heeft diverse richtlijnen voor genterapie studies waarin adviezen over kiemceltransmissie zijn opgenomen. In november 2005 is hieraan een belangrijk document toegevoegd, namelijk de “Annex on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors”<sup>9</sup>. Deze richtlijn is ontstaan uit de verzamelde data en discussies die gevoerd zijn door de EMEA GTWP en stelt dat onderzoek naar onbewuste kiemceltransmissie moet worden uitgevoerd om zo voldoende informatie over dit fenomeen te verzamelen. Algemeen wordt geaccepteerd dat uitvoering van dergelijk onderzoek in klinische studies lastig is, vooral omdat niet-invasief onderzoek van vrouwelijke kiemcellen niet mogelijk is. Betrouwbare preklinische onderzoeken naar kiemceltransmissie zijn daarom van essentiële waarde. Hiervoor is in de Annex een beslisboom opgenomen waarin wordt weergegeven welke preklinische kiemceltransmissie studies uitgevoerd dienen te worden op basis waarvan besloten wordt of een klinische genterapie wel of niet wordt toegestaan. Conform de Directive 2001/20/EC van de Europese Unie mag een klinische genterapie studie niet worden uitgevoerd indien deze kan resulteren in veranderingen in de genetische identiteit van kiemcellen van de deelnemende personen. Belangrijke aspecten in de beslisboom zijn het biodistributieprofiel van de vector met betrekking tot de geslachtsorganen, de lokatie van de vector in de geslachtsorganen en integratie van de vector in eicellen of spermacellen. Factoren die bij de risico-analyse voor kiemceltransmissie en de daaraan gekoppelde opzet van de preklinische studie meegenomen dienen te worden betreffen het type vector, de wijze van toediening, het ziektebeeld en de te behandelen patiëntengroep.

---

<sup>9</sup> <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/genetherapy/27397405en.pdf>

## **8. Conclusies en aanbevelingen**

Dit rapport beschrijft de bevindingen van het project getiteld “Inventarisatie van shedding data en analyses: mogelijkheden voor standaardisering” dat van 1 december 2004 tot en met 28 februari 2006 in opdracht van de COGEM is uitgevoerd op de afdelingen Urologie en Hematologie van Erasmus MC te Rotterdam. Het doel van dit project is het aanreiken van handvaten voor het opstellen van richtlijnen omtrent shedding analyse voor retrovirale, adenovirale, AAV en ALVAC vectoren. Daarnaast zijn shedding data voor deze vectoren verzameld die evidence-based risicoanalyse kunnen ondersteunen.

### **8.1 Overzicht van de bevindingen**

Uit dit rapport blijkt dat shedding een fenomeen is dat daadwerkelijk in klinische genterapie studies met adenovirale, retrovirale, AAV en ALVAC vectoren optreedt (hoofdstuk 2 en 3). Analyse van shedding blijkt echter geen prominent onderdeel van de klinische evaluatie van een genterapeuticum te vormen bij de rapportage over genterapie studies. In wetenschappelijke publicaties over klinische genterapie studies zijn slechts in een beperkt aantal gevallen shedding gegevens opgenomen (hoofdstuk 2). Zelfs in het, tot nu toe, enige artikel over de ontwikkeling van Gendicine, het genterapeuticum dat als eerste ter wereld goedgekeurd is als geneesmiddel (in China geregistreerd voor de behandeling van hoofd/hals kanker), zijn geen shedding data gepubliceerd (Peng 2005). In de publicaties waar wel wordt gerapporteerd over shedding analyse is de informatie vaak beknopt, in tegenstelling tot gegevens over de vector constructie en productie, de patiënten en de opzet en uitkomsten van de klinische studie. Gegevens over de kwaliteit van de shedding assay zoals de specificiteit en de gevoeligheid zijn vaak niet opgenomen. Naast het ontbreken van details over de uitgevoerde shedding analyse, wordt de interpretatie en vergelijking van de gerapporteerde shedding data bemoeilijkt door gebrek aan uniformiteit van toedieningswijze, doseringen, tijdstippen van analyse, geanalyseerde monsters en de wijze waarop de gevoeligheid van de shedding assay wordt uitgedrukt. Ook is de literatuur beperkt wat betreft publicaties over de ontwikkeling van shedding assays. Daarnaast toont dit rapport aan dat de diverse regelgevende instanties in het buitenland tot nu toe geen duidelijke richtlijnen hebben uitgeschreven voor de analyse van shedding en de assays die hierbij toegepast dienen te worden (hoofdstuk 6). Het blijkt dat farmaceutische bedrijven en Contract Research Organizations bij de ontwikkeling van een shedding assay de International Conference on

Harmonisation richtlijnen Q2A en Q2B voor assay validatie hanteren. Deze richtlijnen zijn weliswaar eigenlijk bestemd zijn voor validatie van kwaliteitscontrole testen voor de identiteit, zuiverheid en werkzaamheid van een geneesmiddel (hoofdstuk 4 en 6), maar toepassing van dergelijke richtlijnen kunnen ook bruikbaar zijn voor uniforme assay ontwikkeling en validatie. Tenslotte is geconstateerd dat ook in Nederland shedding analyse bij klinische genterapie studies niet eenduidig en volgens een vastomlijnde strategie wordt uitgevoerd. Gegevens over belangrijke assay karakteristieken, waaruit afgeleid moet kunnen worden dat de data betrouwbaar en relevant zijn, zijn vaak niet bekend bij de principal investigator (hoofdstuk 3).

De bevindingen over shedding analyse en shedding data worden voor elke afzonderlijke vector later in dit hoofdstuk samengevat en geanalyseerd.

## **8.2 Conclisies en aanbevelingen**

Er is momenteel geen uniformiteit in shedding analyse uitgevoerd bij zowel academische als farmaceutische klinische genterapie studies, mede door het gebrek aan richtlijnen.

Implementatie van gestandaardiseerde shedding analyse wordt hierdoor bemoeilijkt.

Standaardisering door middel van generieke shedding assays die voor elke vector toegepast moeten worden wordt als onmogelijk beschouwd. Voor elke virale vector dient immers bij voorkeur een vector-specifieke shedding assay beschikbaar te zijn. Dit betekent dat een shedding assay afgestemd moet worden op het type te analyseren vector. Het is niet haalbaar of noodzakelijk om voor elke vector een volledig gestandaardiseerde test te implementeren die in principe door elk laboratorium op dezelfde wijze uitgevoerd en in elk laboratorium vergelijkbare karakteristieken heeft, zoals identieke gevoeligheid. Er wordt daarom geadviseerd om de standaardisatie van shedding assays te concretiseren door middel van aanbevelingen omtrent de toe te passen methoden en algemene vereisten omtrent technische aspecten en het kwaliteitsniveau van deze methoden. Op deze manier zullen onderzoekers weliswaar niet identieke shedding assay(s) toepassen, maar wel methoden gebruiken die op hetzelfde principe berusten, op uniforme wijze zijn ontwikkeld en een vergelijkbaar kwaliteitsniveau hebben. Hiervoor wordt een uniforme leidraad voorgesteld welke de onderzoeker kan volgen voor het opzetten van een strategie voor shedding analyse. Deze leidraad bevat de volgende stappen:

1. Het bepalen van de noodzaak om shedding analyse uit te voeren



2. Het bepalen in welke excreta en gedurende welke periode shedding analyse uitgevoerd dient te worden
3. Het bepalen van de methode die gebruikt dient te worden voor de shedding analyse
4. Het ontwikkelen en valideren van de shedding assay(s)

Een dergelijke leidraad moet gezien worden als een continu proces dat aangepast kan worden aan de toekomstige ontwikkelingen binnen de gentherapie. Het risico van shedding en eventuele effecten van shedding op mens en milieu kan bijvoorbeeld verhoogd worden door nieuwe generaties virale vectoren zoals replicatie-competente vectoren, toepassing van meer toxische therapeutische genen, of het gebruik van hogere doseringen dan tot nu toe gebruikelijk was. Ook kan het risico juist verlaagd worden door gebruik te maken van virale vectoren met een betere targetting of vectoren met een verbeterde expressie van transgen, waardoor lagere doseringen virale vectoren voldoende kunnen zijn. Belangrijk is wel om te realiseren dat een hogere kans op shedding niet automatisch een groter risico voor het milieu inhoudt. Dit wordt in grote mate bepaald door het type vector, het transgen en de wijze van toediening. Hieronder wordt de voorgestelde leidraad verder uitgewerkt.

### ***8.3 Leidraad voor het opzetten van een strategie voor shedding analyse***

#### **1. Het bepalen van de noodzaak om shedding analyse uit te voeren**

Shedding vormt voor de COGEM een belangrijk aspect bij de beoordeling van de milieurisico's van een klinische gentherapie studie. Het is van belang om op te merken dat shedding analyse geen standaard verplichting is. Indien uit de risicoanalyse blijkt dat de kans op shedding minimaal is of dat de effecten van shedding op mens en milieu aanvaardbaar klein zijn, hoeft de onderzoeker geen shedding analyse uit te voeren. Een dergelijke risicoanalyse dient onderbouwd te worden met theoretische argumenten of historische gegevens. Voor de theoretische onderbouwing zijn het type vector, het transgen en de wijze van toediening van belang. Zo zal shedding van een niet-replicerende adenovirale vector coderend voor thymidine kinase geen risico vormen voor het milieu. De vector kan zich immers niet vermenigvuldigen, daarnaast is thymidine kinase een onschuldig enzym in de afwezigheid van het prodrug Ganciclovir. Effecten van shedding kunnen daarentegen aanzienlijk groter zijn indien in een studie een replicerende vector coderend voor een toxisch gen of een onco-gen wordt gebruikt. Een ander voorbeeld is *ex vivo* gentherapie, waarbij autologe cellen buiten de patiënt behandeld worden met bijvoorbeeld een retrovirale vector. Hierbij dient de onderzoeker uit te sluiten dat de oplossing van cellen waarmee de patiënt wordt behandeld vrije vectordeeltjes bevat. De kans op shedding is bij deze vorm van

gentherapie derhalve minimaal. Dit geldt bijvoorbeeld ook voor studies waarbij de vector intratumoraal wordt toegediend op een plek in het lichaam die niet in een direct contact staat leidend tot verspreiding via excreta.

De historische shedding data die in dit project verzameld zijn kunnen ondersteuning bieden bij evidence-based risicoanalyse. Dergelijke data kunnen alleen toegepast worden indien in de voorgenomen studie gebruikt gemaakt zal worden van een vergelijkbare vector en een vergelijkbare wijze van toediening en doseringsschema. Een belangrijke kanttekening bij de interpretatie van deze historische gegevens is dat in het merendeel van de gevallen voor de shedding analyse gebruik is gemaakt van een PCR. Een positief PCR resultaat duidt op de aanwezigheid van vector DNA, maar is echter geen indicatie voor de aanwezigheid van infectieuze virusdeeltjes. Het is belangrijk om dit onderscheid te maken aangezien shedding van vector DNA geen risico voor het milieu zal vormen. Dit kan wel het geval zijn bij shedding van infectieuze virusdeeltjes. Aanvullende gegevens over shedding van infectieuze virusdeeltjes zijn daarom zeer relevant voor evidence-based risicoanalyse. De gevonden gegevens worden hieronder samengevat (voor details zie bijlage 9.4 en hoofdstuk 2).

#### *Retrovirale vectoren*

In de praktijk blijkt dat in Nederland voor *ex vivo* gentherapie waarbij de patiënt behandeld wordt met autologe cellen die *ex vivo* met een retrovirale vector getransduceerd zijn geen shedding analyse wordt uitgevoerd. Bij deze vorm van gentherapie wordt als voorwaarde gesteld dat in de oplossing van toe te dienen cellen geen vrije vectordeeltjes en/of RCR aanwezig mogen zijn. De kans op vector shedding is door deze voorwaarde te verwaarlozen. In Duitsland geldt eveneens dat de gebruikte vectorbatch vrij dient te zijn van RCR waarna bij *ex vivo* gentherapie vervolgens geen shedding analyse uitgevoerd hoeft te worden. In de Verenigde Staten is de analyse van RCR bij elke gentherapie studie met een retrovirale vector verplicht. Uit de literatuur blijkt dat voor *ex vivo* gentherapie studies alleen gekeken wordt naar het voorkomen van RCR in bloed en niet naar shedding van de vector in excreta. In geen van de gevonden publicaties zijn RCR bij *ex vivo* gentherapie waargenomen. De kans op shedding is aanzienlijk groter bij *in vivo* gentherapie, waarbij een retrovirale vector of vectorproducerende cellen direct worden toegediend. Het blijkt dat shedding analyse bij deze studies, waarbij in de meeste gevallen gebruik is gemaakt van intratumorale toediening, voornamelijk wordt uitgevoerd in bloed. In een aantal van deze studies is shedding van vector DNA in bloed aangetoond (Packer, Raffel et al. 2000; Rainov 2000; Prados, McDermott et al. 2003; Braybrooke, Slade et al. 2005). In drie studies zijn naast bloed of daarvan afgeleide

producten ook andere excreta geanalyseerd. In een studie waarbij vector producerende cellen geïnjecteerd werden in melanoma of huidknobbels afkomstig van borstkanker werd 24 uur na toediening vector DNA aangetroffen in monsters van de huid (Braybrooke, Slade et al. 2005). In speeksel afgenomen van patiënten met longkanker na intratumorale toediening van vector producerende cellen werd geen shedding waargenomen (Roth, Nguyen et al. 1996). Na intratumorale injectie van vector producerende cellen in hersentumoren werd eveneens geen shedding in urine gevonden (Sandmair, Loimas et al. 2000). Er zijn geen aanwijzingen voor het ontstaan van RCR bij *in vivo* gentherapie gevonden. Aan de hand van de literatuur kunnen geen uitspraken gedaan worden over eventuele shedding in urine, feces en excreta van de luchtwegen.

Opvallend is dat geen analyse van infectieuze retrovirale vectordeeltjes wordt uitgevoerd, in tegenstelling tot andere virale vectoren. Dit kan mogelijk verklaard worden door het feit dat dergelijke deeltjes niet als potentieel milieurisico worden beschouwd. De huidige generatie retrovirale vectoren kunnen niet repliceren noch virusdeeltjes vormen aangezien de genen coderend voor *gag*, *pol* en *env*, eiwitten die noodzakelijk zijn voor de vorming van virusdeeltjes, vervangen zijn door het therapeutisch transgen. Op basis van de beperkte hoeveelheid gegevens gevonden over shedding van een retrovirale vector naar semen kunnen geen conclusies getrokken worden over de kans op kiemceltransmissie. Het feit dat in gonadaal weefsel van 26 patiënten die intratumoraal een retrovirale vector kregen toegediend voor de behandeling van hersentumoren geen vector DNA werd aangetroffen, wijst er op dat de kans op verspreiding van een retrovirale vector naar de geslachtsorganen bij deze vorm van toediening klein is.

### *Adenovirale vectoren*

Voor de vier virale vectoren bestudeerd in dit rapport zijn de meeste shedding data gevonden voor replicatie-deficiënte adenovirale vectoren. Dit komt overeen met het feit dat tot op heden in het merendeel van klinische gentherapie studies dit type vector is toegepast. Voor replicatie-deficiënte adenovirale vectoren blijkt dat shedding van vector DNA of infectieuze virusdeeltjes in diverse excreta is gevonden. Opmerkelijk daarbij is dat de vector in de meeste studies lokaal werd toegediend. Shedding is vaak kortdurend en wordt waargenomen in bloed en in excreta die dicht bij de plek van toediening uit het lichaam zijn afgenomen, zoals bijvoorbeeld in urine na intratumorale injectie van de vector in een prostaattumor. In zes studies waarbij een replicatie-deficiënte adenovirale vector werd toegepast zijn monsters geanalyseerd op de vorming van RCA. In alle gevallen bleken deze monsters negatief te zijn.

Een groot aantal publicaties (12 van de 16) over conditioneel-replicerende adenovirale vectoren (crads) handelde over ONYX-015. Voor ONYX-015 en andere crads is shedding voornamelijk bekeken in bloed, ook na intratumorale toediening. In twee studies is hierbij voor ONYX-015 na intratumorale of intraperitoneale toediening geen shedding waargenomen. In vier studies waarbij een crad is toegepast zijn ook andere excreta bestudeerd. Hierbij is shedding gevonden in urine na vector toediening in een prostaattumor (DeWeese, van der Poel et al. 2001; Freytag, Khil et al. 2002), in huid na intradermale toediening (ONYX-015, (Ganly, Kim et al. 2000)) en in ascites en gal na intratumorale of intraperitoneale toediening voor de behandeling van lever/galblaas carcinomen (ONYX-015, (Makower, Rozenblit et al. 2003)). De vondst van een positief semen monster na lokale injectie van een crad in een prostaattumor wijst er op dat bij deze vorm van toediening shedding van de vector via semen kan plaatsvinden (DeWeese, van der Poel et al. 2001).

#### *AAV vectoren*

De historische gegevens voor AAV verzameld in dit rapport zijn beperkt voor evidence-based risicoanalyse. In vijf van de zes gevonden publicaties is de AAV vector intranasaal of via inhalatie toegediend voor de behandeling van cystische fibrose. In vier van deze studies is shedding naar de luchtwegen waargenomen, wat te verwachten is gezien de wijze van toediening. Bij drie van de cystische fibrose studies zijn ook excreta als urine en feces getest op shedding, waarbij geen shedding werd waargenomen. De zesde publicatie betrof een intramusculaire vector toediening in patiënten met hemofilie B. De resultaten van deze studie geven aan dat een AAV vector zich na intramusculaire toediening kan verspreiden naar excreta die ver van de plaats van toediening worden uitgescheiden, zoals urine en speeksel. Het risico van kiemceltransmissie door AAV vectoren lijkt gezien preklinische en klinische gegevens zeer klein te zijn.

#### *ALVAC vectoren*

De historische gegevens voor ALVAC verzameld in dit rapport zijn beperkt voor evidence-based risicoanalyse. In totaal zijn vijf immunogentherapie studies, waaronder twee immunotherapie vaccinatie studies, en vier preventieve vaccinatie studies geanalyseerd. In de immunogentherapie studies waarbij de vector intratumoraal of intramusculair werd toegediend is geen shedding in urine, ontlasting of monsters van de luchtwegen waargenomen. Bij de vijf preventieve en immunotherapie vaccinatie studies waarbij shedding in de huid werd geanalyseerd, werd in drie studies infectieus virus gevonden. In de

preventieve vaccinatie studie waarbij andere excreta (urine, speeksel en bloed) zijn getest, werd geen shedding waargenomen (Adler, Plotkin et al. 1999). Op basis van deze beperkte hoeveelheid resultaten lijkt een ALVAC vector na lokale toediening zich niet te verspreiden naar excreta die ver van de plek van toediening worden uitgescheiden. Een belangrijke bevinding is dat in een immunotherapie vaccinatie studie geen besmetting van de omgeving van de patiënt is waargenomen (Borysiewicz, Fiander et al. 1996). Er zijn geen gegevens gevonden over een potentieel risico van kiemceltransmissie bij de toepassing van ALVAC vectoren.

## **2. Het bepalen in welke excreta en gedurende welke periode shedding analyse uitgevoerd dient te worden**

Voor de patiënt kan het monitoren op shedding behoorlijk belastend zijn, zeker indien regelmatig gedurende langere tijd diverse excreta moeten worden verzameld. Het is daarom van belang dat zorgvuldig wordt afgewogen in welke excreta en gedurende welke periode shedding en met welke frequentie analyse uitgevoerd dient te worden. Dit wordt bepaald door het type vector, de wijze van toediening en het doseringsschema, en de natuurlijke biodistributie van het wildtype virus. Bij lokale toediening zullen monsters dicht bij de plek van toediening geanalyseerd moeten worden, aangezien in het geval van shedding verspreiding van de vector naar dergelijke excreta aannemelijk is. Hierbij kan bijvoorbeeld gedacht worden aan huid bij intradermale injectie, urine bij intratumorale toediening in een prostaattumor of monsters uit de luchtwegen bij intranasale toediening of inhalatie. Voor een replicerende vector kan shedding gedurende een langere periode optreden dan voor replicatie-deficiënte vector. Er kan eveneens een verschil in de duur van shedding zijn tussen meerdere toedieningen en een eenmalige toediening. Zo heeft de FDA geobserveerd dat shedding van een adenovirale vector lijkt af te nemen bij herhaaldelijke toediening, wat mogelijk verklaard kan worden door een afweerreactie-gemedieerde verandering van de farmacokinetiek. Het is op basis van de gevonden gegevens niet mogelijk een advies te geven wanneer shedding analyse beëindigd kan worden. Een overweging zou kunnen zijn om de analyse te stoppen indien een monster herhaaldelijk, bijvoorbeeld op twee opeenvolgende tijdstippen, negatief blijkt te zijn. Overigens dient opgemerkt te worden dat positieve testresultaten te verwachten zijn indien kort na toediening (binnen de eerste uren) monsters van de plek van toediening geanalyseerd worden, zoals bloed na intraveneuze toediening, monsters van de injectieplek na intradermale toediening of monsters van de luchtwegen na intranasale toediening. Voor

shedding analyse en de interpretatie van shedding data zijn dergelijke positieve resultaten minder relevant.

Zoals eerder gesteld, is er in de literatuur geen uniformiteit wat betreft de excreta waarin shedding wordt geanalyseerd alsmede de periode en de frequentie van shedding analyse. De gevonden gegevens worden hieronder samengevat (voor details en de frequentie van shedding analyse wordt verwezen naar bijlage 9.4 en hoofdstuk 2). Deze data kunnen bij het opstellen van een strategie voor shedding analyse alleen toegepast worden indien in de voorgenomen studie gebruikt gemaakt zal worden van een vergelijkbare vector en een vergelijkbare wijze van toediening en doseringsschema.

### *Retrovirale vectoren*

In de studies waarbij getest is op het voorkomen van RCR werd shedding analyse in het algemeen gedurende een langere periode uitgevoerd dan in studies waarin alleen gekeken is naar vector DNA. Analyse van RCR, wat alleen werd uitgevoerd in bloed of daarvan afgeleide producten, werd in het merendeel van de studies voortgezet tot 9 à 12 maanden na behandeling. In twee studies is beschreven dat deze analyse zelfs jaarlijks voortgezet wordt (Simons, Jaffee et al. 1997; Shand, Weber et al. 1999). Deze langdurige monitoring is hoogstwaarschijnlijk het gevolg van de aanbeveling door de FDA om behandelde patiënten jaarlijks levenslang te testen op RCR (zie hoofdstuk 6). RCR wordt overigens voornamelijk als risico voor de patiënt gezien.

Van de 13 studies waarbij excreta zijn getest op de aanwezigheid van vector DNA, zijn in drie studies naast bloed of daarvan afgeleide producten ook andere excreta geanalyseerd. Deze excreta waren in twee studies afkomstig uit de omgeving van de plaats van toediening. In één studie waarbij vector producerende cellen geïnjecteerd werden in melanoma of huidknobbels afkomstig van borstkanker werden monsters van de huid getest (Braybrooke, Slade et al. 2005). In de tweede andere studie betrof het speeksel afgenomen van patiënten met longkanker waarbij de vector intratumoraal werd toegediend (Roth, Nguyen et al. 1996). In de laatste studie werd urine geanalyseerd na intratumorale injectie in hersentumoren (Sandmair, Loimas et al. 2000). Op basis van de bevindingen van deze studie lijkt bij lokale *in vivo* genterapie geen shedding naar excreta die ver van de plek van toediening worden uitgescheiden op te treden. De verzamelde gegevens zijn echter te beperkt om een aanbeveling over te analyseren excreta te doen. De duur van shedding analyse varieerde van 24 uur na toediening (Tait, Obermiller et al. 1997; Tait, Obermiller et al. 1999;

Braybrooke, Slade et al. 2005) tot jaarlijkse analyse (Shand, Weber et al. 1999), en werd gemiddeld drie tot vier weken na toediening voortgezet.

### *Adenovirale vectoren*

Een opvallende bevinding is dat in klinische studies met replicatie-deficiënte adenovirale vectoren shedding in een breed scala aan excreta is geanalyseerd (voor details zie bijlage 9.4), terwijl voor crads als ONYX-015 en andere virale vectoren shedding analyse zich voornamelijk beperkt tot bloed of daarvan afgeleide producten. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat in de studies met replicatie-deficiënte vectoren, die in een vroegere fase van de klinische genterapie zijn gestart, de opzet van shedding analyse meer uitgebreid was wegens het ontbreken van historische gegevens. Op basis van de gevonden shedding data bestaat de mogelijkheid dat een adenovirale vector zich verspreidt naar excreta die dicht bij de plek van toediening worden uitgescheiden, zoals urine na vector injectie in een prostaattumor. De wijze van toediening is daarom van groot belang bij de keuze van te testen excreta.

Voor replicatie-deficiënte vectoren varieert de duur van shedding analyse van één dag tot één jaar in de gevonden publicaties. In een groot deel van de studies wordt shedding dagelijks gedurende een week of met grotere intervallen gedurende drie tot vier weken geanalyseerd. In een aantal studies wordt vermeld dat shedding analyse beëindigd werd als resultaten negatief waren (zie bijlage 9.4). Bloed of daarvan afgeleide producten werd in het merendeel van alle studies geanalyseerd.

In vier studies waarbij een crad is toegepast zijn naast bloed ook andere excreta bestudeerd, namelijk urine na vector toediening in een prostaattumor (DeWeese, van der Poel et al. 2001; Freytag, Khil et al. 2002), huid na intradermale toediening (ONYX-015, (Ganly, Kirn et al. 2000)) en ascites en gal na intratumorale of intraperitoneale toediening voor de behandeling van lever/galblaas carcinomen (ONYX-015, (Makower, Rozenblit et al. 2003)). Opvallend is dat de duur van shedding analyse van crads niet verschilt ten opzichte van replicatie-deficiënte vectoren. In sommige studies werd analyse zelfs beperkt tot de eerste dagen na toediening (Vasey, Shulman et al. 2002; Hamid, Varterasian et al. 2003). Omdat deze vectoren kunnen repliceren, is theoretisch te verwachten dat shedding gedurende een langere periode kan blijven optreden. In twee studies zijn bewijzen voor *in vivo* replicatie gevonden gebaseerd op een afname gevolgd door een toename van viraal DNA in het bloed van behandelde patiënten (DeWeese, van der Poel et al. 2001; Galanis, Okuno et al. 2005).

### *AAV vectoren*

In vijf van de zes gevonden publicaties betrof het studies voor de behandeling van cystische fibrose door middel van vector inhalatie of intranasale vector toediening. In deze studies zijn excreta uit het gebied van toediening, namelijk monsters uit de luchtwegen als speeksel en neus/keeluitstrijkjes, en bloed geanalyseerd op shedding. Bij drie van deze studies zijn daarnaast ook excreta als urine en feces getest op shedding. In de zesde publicatie waarbij patiënten met hemofilie B behandeld werden met een intramusculaire vector toediening werd shedding in diverse excreta bekeken, namelijk serum, speeksel, urine, ontlasting en semen. Op basis van de shedding resultaten van deze laatste studie lijkt een AAV vector zich na intramusculaire toediening te kunnen verspreiden naar excreta die ver van de plaats van toediening worden uitgescheiden. De duur van shedding analyse varieerde van twee tot elf weken.

### *ALVAC vectoren*

In vijf van de preventieve en immunotherapie vaccinaties studies zijn huidmonsters geanalyseerd die rond de plek van de intradermale toediening zijn afgenomen. In één studie zijn daarnaast ook de wondkorst en een keeluitstrijkje getest (Borysiewicz, Fiander et al. 1996). In de zesde vaccinatie studie zijn geen huidmonsters op shedding geanalyseerd, maar urine, speeksel en bloed. In de overige immunogentherapie studies, waarbij de vector in één studie intratumoraal werd toegediend en in de andere twee studies intramusculair, zijn bloed en urine op shedding getest. In twee studies zijn daarnaast ook monsters uit de luchtwegen geanalyseerd en in één studie ontlasting. De shedding data geven aan dat een ALVAC vector zich na lokale toediening niet lijkt te verspreiden naar excreta die ver van de plek van toediening worden uitgescheiden. De duur van shedding analyse varieerde van een week tot zeven maanden.

De kans op besmetting van derden of de omgeving is overigens het grootst op het moment van toediening van de vector, waarbij grote hoeveelheden virusdeeltjes worden overgebracht in de patiënt. Dit cruciale moment vormt juist geen onderdeel van de huidige shedding analyses, aangezien excreta pas uren of dagen na toediening van de vector worden getest en het niet gebruikelijk is om monsters uit de omgeving van de patiënt te analyseren. Er is in dit rapport een beperkte hoeveelheid gegevens verzameld over besmetting van de omgeving van de behandelde patiënt, zoals in hoofdstuk 2 en hierboven is beschreven voor adenovirale en ALVAC vectoren. Op basis hiervan kunnen geen harde conclusies getrokken worden of



analyse van monsters afgenomen uit de omgeving tijdens vector toediening wenselijk zou zijn.

### **3. Het bepalen van de methode die gebruikt dient te worden voor de shedding analyse**

Voor een goede inschatting van de milieurisico's van genterapie moet shedding analyse een indicatie van de mate van infectiviteit van excreta opleveren. Een combinatie van PCR en een biologische assay wordt hiervoor voorgesteld. Met behulp van de PCR kan snel en betrouwbaar worden vastgesteld of er vector DNA aanwezig is in excreta. In het geval van een positief PCR resultaat kan de biologische assay vervolgens uitsluitend geven of er sprake is van infectieuze virusdeeltjes. De kwantitatieve real-time PCR zou de voorkeur genieten boven de conventionele, niet-quantitatieve PCR. Er dient echter rekening gehouden te worden met het feit dat de real-time PCR niet in elk laboratorium een standaardmethode is. Voor een uitgebreide beschrijving van de PCR en de diverse soorten biologische assays wordt verwezen naar hoofdstuk 5.

Uit dit rapport blijkt dat voor shedding analyse van een adenovirale vector soms ook gebruik gemaakt wordt van een ELISA die ontwikkeld is voor het klinisch vaststellen van een actieve infectie met adenovirus. Zoals beschreven in hoofdstuk 5 wordt deze methode niet geschikt geacht voor shedding analyse aangezien een dergelijke test niet vector-specifiek is noch infectieuze virusdeeltjes kan meten. De ELISA heeft derhalve geen toegevoegde waarde ten opzichte van de PCR en de biologische assay.

In Tabel 8.1 wordt een overzicht gegeven van de voor- en nadelen van de PCR en de biologische assay.

**Tabel 8.1: Voor- en nadelen van de PCR en de biologische assay**

	<b>PCR</b>	<b>Biologische assay</b>
<b>Voordelen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hoge gevoeligheid (&lt; 5 kopieën DNA of RNA)</li> <li>- Groot dynamisch bereik (7-8 log)</li> <li>- Nauwkeurig</li> <li>- Vector-specifiek</li> <li>- Snel</li> <li>- Kan kwantitatief worden toegepast</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Detectie van infectieuze virusdeeltjes</li> <li>- Generiek toepasbaar voor een bepaald virustype</li> </ul>
<b>Nadelen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Geen data over infectiviteit van gevonden viraal erfelijk materiaal</li> <li>- Gevoelig voor methodologische variaties</li> <li>- PCR inhibitie door componenten uit het te analyseren monster</li> <li>- Voor elke vector opnieuw te ontwikkelen en te optimaliseren</li> <li>- Kwantitatieve PCR vereist technische expertise en speciale apparatuur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Biologische assay, waardoor minder nauwkeurig</li> <li>- Niet vector-specifiek, bevestiging met tweede assay noodzakelijk</li> <li>- Arbeids- en tijdsintensief</li> <li>- Gevoelig voor kwaliteit van te analyseren monster</li> </ul>
<b>Aandachtspunten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kwantitatieve PCR tot op heden niet gebruikelijk voor shedding analyse</li> <li>- Bij ontwikkeling moet gelet worden op mogelijk remmende effecten van plasma, serum, urine en semen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Adequate afname en opslag van te analyseren monsters noodzakelijk</li> <li>- Semen kan toxisch zijn voor cellen</li> </ul>

Zoals blijkt uit Tabel 8.1 is de PCR gevoelig voor technische variaties en kan de assay geremd worden door storende factoren aanwezig in het monster, zoals hemoglobine (volbloed), urea (urine), heparine (plasma) en grote hoeveelheden DNA (semen). In het kader hiervan kunnen de volgende aanbevelingen worden gedaan:

- Voorkomen van vervuiling met DNA- en RNA-afbrekende enzymen en DNA of RNA fragmenten uit de omgeving
- Optimalisatie van primers:
  - o primers dienen niet complementair aan zichzelf of elkaar te zijn
  - o de lengte van de primer dient 15 tot 30 basen te bedragen met een base G/base C verhouding van 20-80%
  - o het amplicon mag een maximale grootte van 500 baseparen hebben
  - o nested PCR wordt afgeraden
- Het bestuderen van mogelijke matrix effecten van de te testen excreta tijdens de ontwikkeling van de PCR en het uitvoeren van de juiste controles voor PCR inhibitie door middel van spiking van interne controles die een positief resultaat moeten opleveren

Toch kan nooit helemaal uitgesloten worden dat er variatie zal optreden tussen monsters afgenomen van uiteenlopende patiënten en tijdens verschillende visites.

Naast de vele voordelen heeft de PCR als shedding assay een belangrijk nadeel dat op basis van het resultaat geen uitspraak gedaan kan worden of er sprake is van de aanwezigheid van infectieuze virusdeeltjes of van stukjes viraal erfelijk materiaal dat als afbraakproducten in excreta zijn terechtgekomen. Infectieuze virusdeeltjes vormen een veel groter risico voor het milieu dan een stukje viraal DNA. Dit nadeel wordt ondervangen door bij een positief PCR resultaat een biologische assay uit te voeren. Gezien de hogere gevoeligheid van de PCR ten opzichte van die van de biologische assay kan een negatief PCR resultaat beschouwd worden als aanwijzing voor de afwezigheid van virusdeeltjes.

Naast de algemene technische aanbevelingen heeft dit rapport een aantal vectorspecifieke aandachtspunten naar voren gebracht, te weten de volgende:

- Voor de *in vivo* toepassing van retrovirale vectoren blijkt dat het niet gebruikelijk is om shedding analyse van infectieuze vectordeeltjes uit te voeren. Shedding analyse beperkt zich tot het bepalen van vector DNA door middel van PCR, en RCR door middel van PCR en/of een biologische assay zoals de marker rescue assay of de S<sup>+</sup>/L<sup>-</sup> assay (zie hoofdstuk 5). Er zal bekeken moeten worden of het gewenst is dit als zodanig in de op te stellen leidraad op te nemen.
- Virale vectoren kunnen binden aan bloedcellen, zoals bijvoorbeeld beschreven is voor het veelvuldig toegepaste adenovirus serotype 5 (Cichon, Boeckh-Herwig et al. 2003; Stone, Ni et al. 2005). Het is daarom theoretisch meest optimaal om shedding van een virale vector te analyseren in volbloed, waarin de cellen nog aanwezig zijn, en niet in afgeleide producten als serum en plasma, waarbij de cellen grotendeels verwijderd zijn. Uit praktische overwegingen kan de voorkeur toch uitgaan naar serum en plasma. De monsters kunnen makkelijk voor langere tijd worden opgeslagen en hemoglobine aanwezig in volbloed kan storen in de PCR. In dat geval dient rekening gehouden te moeten worden dat de gegevens een onderschatting van de daadwerkelijke shedding kunnen zijn.

Algemeen kan gesteld worden dat het op een juiste manier van verzamelen, coderen, transporteren en opslaan van monsters voor shedding analyse evident mag zijn en uiteraard van groot belang is. In de praktijk blijkt dit echter nog geen routinehandeling te zijn.

#### **4. Het ontwikkelen en valideren van de shedding assay(s)**

Voor de ontwikkeling en validatie van shedding assays vormen de International Conference on Harmonisation richtlijnen Q2A en Q2B voor assay validatie een goed uitgangspunt.

Met behulp van deze richtlijnen en afhankelijk van het type shedding assay (niet-kwantitatief of kwantitatief) kan vastgesteld worden over welke assay karakteristieken de onderzoeker gegevens dient aan te leveren bij de vergunningsaanvraag. Eveneens kunnen hier bepaalde kwaliteitseisen aan worden opgehangen. De belangrijkste assay karakteristieken zijn:

- Specificiteit (niet-kwantitatieve en kwantitatieve assays)

Specificiteit is van groot belang, omdat binnen een klinische studie een vals-positief of vals-negatief shedding resultaat vergaande consequenties kan hebben. Met name het vermogen om onderscheid te maken tussen de vector en wildtype virus is essentieel om informatieve shedding data te verkrijgen.

- Gevoeligheid (niet-kwantitatieve en kwantitatieve assays)

Door het vaststellen van de gevoeligheid van de assay (detectiegrens voor niet-kwantitatieve assay en kwantificeringsgrens voor kwantitatieve assay) kan op basis van de uitkomsten van de shedding analyse een uitspraak worden gedaan over de hoeveelheid vector die in het milieu is terechtgekomen. Afhankelijk van het type assay kan een bepaalde specificatie voor de gevoeligheid worden voorgeschreven om te garanderen dat de shedding assay in het juiste bereik kan meten. Zo heeft de FDA een richtlijn opgesteld voor de gevoeligheid van een kwantitatieve PCR, waarin een gevoeligheid van < 100 kopieën per µg genomisch DNA wordt aanbevolen.

Naast specificiteit en gevoeligheid zijn voor een kwantitatieve assay ook de accuraatheid, nauwkeurigheid, lineariteit en het bereik belangrijke assay karakteristieken.

Specificaties voor de hierboven beschreven assay karakteristieken kunnen per shedding assay vastgesteld worden vanuit zowel een theoretische benadering als een praktische benadering.

Voor bijvoorbeeld de gevoeligheid kan geëist worden dat een assay aan een op voorhand vastgestelde specificatie moet voldoen. Andere karakteristieken kunnen door de onderzoeker getoetst en vastgelegd worden, waarna het Ministerie van VROM kan beoordelen of dit acceptabel is. Er wordt aanbevolen om richtlijnen op te stellen betreffende het verwachte kwaliteitsniveau van shedding assays alsmede de uitvoering van de assay validatie.

#### **8.4 Slotopmerkingen**

Een belangrijke kanttekening bij shedding analyse is dat onduidelijk is wat eventuele consequenties van positieve shedding resultaten kunnen zijn. Het is onbekend of besmetting met patiëntenexcreta die infectieuze virusdeeltjes bevatten daadwerkelijk kan leiden tot een infectie en daarmee samenhangende klinische symptomen. Dierstudies en koppeling van shedding data aan gegevens over het natuurlijke infectieverloop van het wildtype virus zouden meer duidelijkheid kunnen verschaffen over mogelijke effecten van shedding. Wat betreft dit laatste zijn shedding data uit de literatuur minder geschikt, aangezien deze analyses voornamelijk uitgevoerd zijn met een PCR. De aanwezigheid van viraal DNA hoeft immers geen indicatie te zijn voor de aanwezigheid van infectieuze virusdeeltjes. Tijdens de EMEA Gene Therapy Working Party vergadering op 20 januari 2006 in Londen, waarin dit project is gepresenteerd, zijn deze discussiepunten ter tafel gekomen. Deze groep van experts deelt de mening van de projectuitvoerders dat standaardisering van shedding assays het best uitgevoerd kan worden door middel van aanbevelingen voor de methodiek en validatie van shedding assays.

De in dit rapport voorgestelde leidraad zal verder uitgewerkt moeten worden met de diverse belanghebbende partijen, zoals de beoordelaars van aanvragen, genterapie onderzoekers en experts in de virologie. Teneinde evidence-based risicoanalyse in de toekomst te ondersteunen is shedding analyse bij studies waarvan de te verwachten effecten van shedding op mens en milieu minimaal zijn toch het overwegen waard.

## 9. Bijlagen

### 9.1 Referentielijst

- Abken, H., C. Butzler, et al. (1987). "Adenovirus type 5 persisting in human lymphocytes is unlikely to be involved in immortalization of lymphoid cells by fusion with cytoplasts or by transfection with DNA of mouse L cells." *Anticancer Res* **7**(4A): 553-8.
- Abonour, R., D. A. Williams, et al. (2000). "Efficient retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance 1 gene into autologous human long-term repopulating hematopoietic stem cells." *Nat Med* **6**(6): 652-8.
- Adler, S. P., S. A. Plotkin, et al. (1999). "A canarypox vector expressing cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B primes for antibody responses to a live attenuated CMV vaccine (Towne)." *J Infect Dis* **180**(3): 843-6.
- Aitken, M. L., R. B. Moss, et al. (2001). "A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease." *Hum Gene Ther* **12**(15): 1907-16.
- Amado, R. G., R. T. Mitsuyasu, et al. (2004). "Anti-human immunodeficiency virus hematopoietic progenitor cell-delivered ribozyme in a phase I study: myeloid and lymphoid reconstitution in human immunodeficiency virus type-1-infected patients." *Hum Gene Ther* **15**(3): 251-62.
- Arruda, V. R., P. A. Fields, et al. (2001). "Lack of germline transmission of vector sequences following systemic administration of recombinant AAV-2 vector in males." *Mol Ther* **4**(6): 586-92.
- Arya, M., I. S. Shergill, et al. (2005). "Basic principles of real-time quantitative PCR." *Expert Rev Mol Diagn* **5**(2): 209-19.
- Atkinson, E. M., D. J. Debelak, et al. (1998). "A high-throughput hybridization method for titer determination of viruses and gene therapy vectors." *Nucleic Acids Res* **26**(11): 2821-3.
- Baldwin, P. J., S. H. van der Burg, et al. (2003). "Vaccinia-expressed human papillomavirus 16 and 18 e6 and e7 as a therapeutic vaccination for vulval and vaginal intraepithelial neoplasia." *Clin Cancer Res* **9**(14): 5205-13.
- Bellon, G., L. Michel-Calemard, et al. (1997). "Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial." *Hum Gene Ther* **8**(1): 15-25.
- Bleijds, D. A. (2005). "Workshop on shedding data from gene therapy studies with viral vectors. Amsterdam, January 22, 2004." *J Gene Med* **7**: 256 - 259.
- Borysiewicz, L. K., A. Fiander, et al. (1996). "A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer." *Lancet* **347**(9014): 1523-7.
- Braybrooke, J. P., A. Slade, et al. (2005). "Phase I study of MetXia-P450 gene therapy and oral cyclophosphamide for patients with advanced breast cancer or melanoma." *Clin Cancer Res* **11**(4): 1512-20.
- Buller, R. E., I. B. Runnebaum, et al. (2002). "A phase I/II trial of rAd/p53 (SCH 58500) gene replacement in recurrent ovarian cancer." *Cancer Gene Ther* **9**(7): 553-66.
- Cichon, G., S. Boeckh-Herwig, et al. (2003). "Titer determination of Ad5 in blood: a cautionary note." *Gene Ther* **10**(12): 1012-7.
- Clayman, G. L., A. K. el-Naggar, et al. (1998). "Adenovirus-mediated p53 gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma." *J Clin Oncol* **16**(6): 2221-32.
- Cooney, E. L., A. C. Collier, et al. (1991). "Safety of and immunological response to a recombinant vaccinia virus vaccine expressing HIV envelope glycoprotein." *Lancet* **337**(8741): 567-72.
- Corey, L., M. J. McElrath, et al. (1998). "Cytotoxic T cell and neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 envelope with a combination vaccine regimen. AIDS Vaccine Evaluation Group." *J Infect Dis* **177**(2): 301-9.
- Couto, L., A. Parker, et al. (2004). "Direct exposure of mouse spermatozoa to very high concentrations of a serotype-2 adeno-associated virus gene therapy vector fails to lead to germ cell transduction." *Hum Gene Ther* **15**(3): 287-91.
- Crystal, R. G., N. G. McElvaney, et al. (1994). "Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis." *Nat Genet* **8**(1): 42-51.
- de Poorter, J. J., T. C. Tolboom, et al. (2005). "Towards gene therapy in prosthesis loosening: efficient killing of interface cells by gene-directed enzyme prodrug therapy with nitroreductase and the prodrug CB1954." *J Gene Med* **7**(11): 1421-8.
- DeWeese, T. L., H. van der Poel, et al. (2001). "A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy." *Cancer Res* **61**(20): 7464-72.

- DeWeese, T. L., H. van der Poel, et al. (2001). "A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy." *Cancer Res* **61**(20): 7464-72.
- Dummer, R., J. Bergh, et al. (2000). "Biological activity and safety of adenoviral vector-expressed wild-type p53 after intratumoral injection in melanoma and breast cancer patients with p53-overexpressing tumors." *Cancer Gene Ther* **7**(7): 1069-76.
- Dummer, R., J. C. Hassel, et al. (2004). "Adenovirus-mediated intralesional interferon-gamma gene transfer induces tumor regressions in cutaneous lymphomas." *Blood* **104**(6): 1631-8.
- Dunbar, C. E., D. B. Kohn, et al. (1998). "Retroviral transfer of the glucocerebrosidase gene into CD34+ cells from patients with Gaucher disease: in vivo detection of transduced cells without myeloablation." *Hum Gene Ther* **9**(17): 2629-40.
- Edwards, K., J. Logan, et al. (2004). *Real-time PCR. An essential guide*. Wymondham, United Kingdom, Horizon Bioscience.
- Fallaux, F. J., O. Kranenburg, et al. (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**(2): 215-22.
- Flotte, T. R., P. L. Zeitlin, et al. (2003). "Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study." *Hum Gene Ther* **14**(11): 1079-88.
- Fox, J. P., C. D. Brandt, et al. (1969). "The virus watch program: a continuing surveillance of viral infections in metropolitan New York families. VI. Observations of adenovirus infections: virus excretion patterns, antibody response, efficiency of surveillance, patterns of infections, and relation to illness." *Am J Epidemiol* **89**(1): 25-50.
- Freytag, S. O., M. Khil, et al. (2002). "Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer." *Cancer Res* **62**(17): 4968-76.
- Freytag, S. O., H. Stricker, et al. (2003). "Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double-suicide gene therapy in combination with conventional-dose three-dimensional conformal radiation therapy for the treatment of newly diagnosed, intermediate- to high-risk prostate cancer." *Cancer Res* **63**(21): 7497-506.
- Galanis, E., S. H. Okuno, et al. (2005). "Phase I-II trial of ONYX-015 in combination with MAP chemotherapy in patients with advanced sarcomas." *Gene Ther* **12**(5): 437-45.
- Ganly, I., D. Kirn, et al. (2000). "A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer." *Clin Cancer Res* **6**(3): 798-806.
- Germano, I. M., J. Fable, et al. (2003). "Adenovirus/herpes simplex-thymidine kinase/ganciclovir complex: preliminary results of a phase I trial in patients with recurrent malignant gliomas." *J Neurooncol* **65**(3): 279-89.
- Gilly, F. N., A. Beaujard, et al. (1999). "Gene therapy with Adv-IL-2 in unresectable digestive cancer: phase I-II study, intermediate report." *Hepatogastroenterology* **46 Suppl 1**: 1268-73.
- Gilly, F. N., A. C. Sayag-Beaujard, et al. (1998). "Gene therapy with AdV-IL2 (TG 1021) in unresectable digestive adenocarcinoma. Phase I-II study, first inclusions." *Adv Exp Med Biol* **451**: 527-30.
- Gonin, P. and C. Gaillard (2004). "Gene transfer vector biodistribution: pivotal safety studies in clinical gene therapy development." *Gene Ther* **11 Suppl 1**: S98-S108.
- Gordon, J. W. (2001). "Direct exposure of mouse ovaries and oocytes to high doses of an adenovirus gene therapy vector fails to lead to germ cell transduction." *Mol Ther* **3**(4): 557-64.
- Graham, B. S., R. B. Belshe, et al. (1992). "Vaccination of vaccinia-naive adults with human immunodeficiency virus type 1 gp160 recombinant vaccinia virus in a blinded, controlled, randomized clinical trial. The AIDS Vaccine Clinical Trials Network." *J Infect Dis* **166**(2): 244-52.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* **36**(1): 59-74.
- Grines, C. L., M. W. Watkins, et al. (2002). "Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris." *Circulation* **105**(11): 1291-7.
- Griscelli, F., P. Opolon, et al. (2003). "Recombinant adenovirus shedding after intratumoral gene transfer in lung cancer patients." *Gene Ther* **10**(5): 386-95.
- Habib, N., H. Salama, et al. (2002). "Clinical trial of E1B-deleted adenovirus (dl1520) gene therapy for hepatocellular carcinoma." *Cancer Gene Ther* **9**(3): 254-9.
- Hamid, O., M. L. Varterasian, et al. (2003). "Phase II trial of intravenous CI-1042 in patients with metastatic colorectal cancer." *J Clin Oncol* **21**(8): 1498-504.
- Harvey, B. G., P. L. Leopold, et al. (1999). "Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus." *J Clin Invest* **104**(9): 1245-55.

- Harvey, B. G., S. Worgall, et al. (1999). "Cellular immune responses of healthy individuals to intradermal administration of an E1-E3- adenovirus gene transfer vector." *Hum Gene Ther* **10**(17): 2823-37.
- Hasenburg, A., X. W. Tong, et al. (2000). "Thymidine kinase gene therapy with concomitant topotecan chemotherapy for recurrent ovarian cancer." *Cancer Gene Ther* **7**(6): 839-44.
- Hedman, M., J. Hartikainen, et al. (2003). "Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT)." *Circulation* **107**(21): 2677-83.
- Herman, J. R., H. L. Adler, et al. (1999). "In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: a phase I clinical trial." *Hum Gene Ther* **10**(7): 1239-49.
- Hesdorffer, C., J. Ayello, et al. (1998). "Phase I trial of retroviral-mediated transfer of the human MDR1 gene as marrow chemoprotection in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation." *J Clin Oncol* **16**(1): 165-72.
- Hoogerbrugge, P. M., V. W. van Beusechem, et al. (1996). "Bone marrow gene transfer in three patients with adenosine deaminase deficiency." *Gene Ther* **3**(2): 179-83.
- Hoogerbrugge, P. M., J. M. Vossen, et al. (1992). "Treatment of patients with severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase (ADA) deficiency by autologous transplantation of genetically modified bone marrow cells." *Hum Gene Ther* **3**(5): 553-8.
- Imler, J. L., C. Chartier, et al. (1996). "Novel complementation cell lines derived from human lung carcinoma A549 cells support the growth of E1-deleted adenovirus vectors." *Gene Ther* **3**(1): 75-84.
- Immonen, A., M. Vapalahti, et al. (2004). "AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study." *Mol Ther* **10**(5): 967-72.
- Joseph, P. M., B. P. O'Sullivan, et al. (2001). "Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. I. Methods, safety, and clinical implications." *Hum Gene Ther* **12**(11): 1369-82.
- Kang, W. K., C. Park, et al. (2001). "Interleukin 12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: outcome of a phase I study." *Hum Gene Ther* **12**(6): 671-84.
- Kaptein, L. C. M. (2005). *Gentherapie: Lessen uit het verleden en een blik in de toekomst*. Downloaden via [www.cogem.net](http://www.cogem.net).
- Kay, M. A., C. S. Manno, et al. (2000). "Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector." *Nat Genet* **24**(3): 257-61.
- Khorana, A. A., J. D. Rosenblatt, et al. (2003). "A phase I trial of immunotherapy with intratumoral adenovirus-interferon-gamma (TG1041) in patients with malignant melanoma." *Cancer Gene Ther* **10**(4): 251-9.
- Kim, S., E. J. Park, et al. (2004). "Development of enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to replication-competent murine leukemia virus." *J Virol Methods* **118**(1): 1-7.
- Klatzmann, D., P. Cherin, et al. (1998). "A phase I/II dose-escalation study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for metastatic melanoma. Study Group on Gene Therapy of Metastatic Melanoma." *Hum Gene Ther* **9**(17): 2585-94.
- Klatzmann, D., C. A. Valery, et al. (1998). "A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma. Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma." *Hum Gene Ther* **9**(17): 2595-604.
- Knipe, D. M. and P. M. Howley (2001). *Fields Virology, 4th edition*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Knowles, M. R., K. W. Hohneker, et al. (1995). "A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis." *N Engl J Med* **333**(13): 823-31.
- Kohn, D. B., G. Bauer, et al. (1999). "A clinical trial of retroviral-mediated transfer of a rev-responsive element decoy gene into CD34(+) cells from the bone marrow of human immunodeficiency virus-1-infected children." *Blood* **94**(1): 368-71.
- Kuball, J., S. F. Wen, et al. (2002). "Successful adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with bladder cancer by intravesical vector instillation." *J Clin Oncol* **20**(4): 957-65.
- Kubo, H., T. A. Gardner, et al. (2003). "Phase I dose escalation clinical trial of adenovirus vector carrying osteocalcin promoter-driven herpes simplex virus thymidine kinase in localized and metastatic hormone-refractory prostate cancer." *Hum Gene Ther* **14**(3): 227-41.
- Lamers, C. H., S. Sleijfer, et al. (2004). "Adoptive immuno-gene therapy of cancer with single chain antibody [scFv(Ig)] gene modified T lymphocytes." *J Biol Regul Homeost Agents* **18**(2): 134-40.
- Lamers, C. H., R. A. Willemsen, et al. (2002). "Protocol for gene transduction and expansion of human T lymphocytes for clinical immunogene therapy of cancer." *Cancer Gene Ther* **9**(7): 613-23.
- Lang, F. F., J. M. Bruner, et al. (2003). "Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results." *J Clin Oncol* **21**(13): 2508-18.
- Long, Z., L. P. Li, et al. (1998). "Biosafety monitoring of patients receiving intracerebral injections of murine retroviral vector producer cells." *Hum Gene Ther* **9**(8): 1165-72.



- Lovatt, A. (2002). "Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products." *J Biotechnol* **82**(3): 279-300.
- Lu, W., S. Zheng, et al. (2004). "Intra-tumor injection of H101, a recombinant adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with advanced cancers: a pilot phase II clinical trial." *World J Gastroenterol* **10**(24): 3634-8.
- Makinen, K., H. Manninen, et al. (2002). "Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study." *Mol Ther* **6**(1): 127-33.
- Makower, D., A. Rozenblit, et al. (2003). "Phase II clinical trial of intralesional administration of the oncolytic adenovirus ONYX-015 in patients with hepatobiliary tumors with correlative p53 studies." *Clin Cancer Res* **9**(2): 693-702.
- Malech, H. L., P. B. Maples, et al. (1997). "Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(22): 12133-8.
- Martineau, D., W. M. Klump, et al. (1997). "Evaluation of PCR and ELISA assays for screening clinical trial subjects for replication-competent retrovirus." *Hum Gene Ther* **8**(10): 1231-41.
- Menegus, M. A. (1991). *Textbook of Human Virology*. St. Louis, Mosby Year Book.
- Merrouche, Y., S. Negrier, et al. (1995). "Clinical application of retroviral gene transfer in oncology: results of a French study with tumor-infiltrating lymphocytes transduced with the gene of resistance to neomycin." *J Clin Oncol* **13**(2): 410-8.
- Mitsuyasu, R. T., P. A. Anton, et al. (2000). "Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects." *Blood* **96**(3): 785-93.
- Moss, R. B., D. Rodman, et al. (2004). "Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial." *Chest* **125**(2): 509-21.
- Mukherjee, S., T. Haenel, et al. (2000). "Replication-restricted vaccinia as a cytokine gene therapy vector in cancer: persistent transgene expression despite antibody generation." *Cancer Gene Ther* **7**(5): 663-70.
- Mulvihill, S., R. Warren, et al. (2001). "Safety and feasibility of injection with an E1B-55 kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX-015) into primary carcinomas of the pancreas: a phase I trial." *Gene Ther* **8**(4): 308-15.
- Mundt, A. J., S. Vijayakumar, et al. (2004). "A Phase I trial of TNFerade biologic in patients with soft tissue sarcoma in the extremities." *Clin Cancer Res* **10**(17): 5747-53.
- Nemunaitis, J., C. Cunningham, et al. (2001). "Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity." *Gene Ther* **8**(10): 746-59.
- Nemunaitis, J., C. Cunningham, et al. (2003). "Pilot trial of intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in combination with chemotherapy or IL-2 treatment in refractory cancer patients." *Cancer Gene Ther* **10**(5): 341-52.
- Nemunaitis, J., T. Fong, et al. (1999). "Phase I trial of interferon gamma retroviral vector administered intratumorally with multiple courses in patients with metastatic melanoma." *Hum Gene Ther* **10**(8): 1289-98.
- Nemunaitis, J., F. Khuri, et al. (2001). "Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer." *J Clin Oncol* **19**(2): 289-98.
- Nemunaitis, J., S. G. Swisher, et al. (2000). "Adenovirus-mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* **18**(3): 609-22.
- Pachori, A. S., L. G. Melo, et al. (2004). "Potential for germ line transmission after intramyocardial gene delivery by adeno-associated virus." *Biochem Biophys Res Commun* **313**(3): 528-33.
- Packer, R. J., C. Raffel, et al. (2000). "Treatment of progressive or recurrent pediatric malignant supratentorial brain tumors with herpes simplex virus thymidine kinase gene vector-producer cells followed by intravenous ganciclovir administration." *J Neurosurg* **92**(2): 249-54.
- Paielli, D. L., M. S. Wing, et al. (2000). "Evaluation of the biodistribution, persistence, toxicity, and potential of germ-line transmission of a replication-competent human adenovirus following intraprostatic administration in the mouse." *Mol Ther* **1**(3): 263-74.
- Palmer, D. H., V. Mautner, et al. (2004). "Virus-directed enzyme prodrug therapy: intratumoral administration of a replication-deficient adenovirus encoding nitroreductase to patients with resectable liver cancer." *J Clin Oncol* **22**(9): 1546-52.
- Peng, Z. (2005). "Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers." *Hum Gene Ther* **16**(9): 1016-27.

- Perricone, M. A., J. E. Morris, et al. (2001). "Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. II. Transfection efficiency in airway epithelium." *Hum Gene Ther* **12**(11): 1383-94.
- Peters, A. H., J. Drumm, et al. (2001). "Absence of germline infection in male mice following intraventricular injection of adenovirus." *Mol Ther* **4**(6): 603-13.
- Powell, J. S., M. V. Ragni, et al. (2003). "Phase I trial of FVIII gene transfer for severe hemophilia A using a retroviral construct administered by peripheral intravenous infusion." *Blood* **102**(6): 2038-45.
- Prados, M. D., M. McDermott, et al. (2003). "Treatment of progressive or recurrent glioblastoma multiforme in adults with herpes simplex virus thymidine kinase gene vector-producer cells followed by intravenous ganciclovir administration: a phase I/II multi-institutional trial." *J Neurooncol* **65**(3): 269-78.
- Rainov, N. G. (2000). "A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme." *Hum Gene Ther* **11**(17): 2389-401.
- Rajagopalan, S., E. R. Mohler, 3rd, et al. (2003). "Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication." *Circulation* **108**(16): 1933-8.
- Ram, Z., K. W. Culver, et al. (1997). "Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells." *Nat Med* **3**(12): 1354-61.
- Reeves, L., L. Duffy, et al. (2002). "Detection of ecotropic replication-competent retroviruses: comparison of s(+)/l(-) and marker rescue assays." *Hum Gene Ther* **13**(14): 1783-90.
- Reid, T., E. Galanis, et al. (2001). "Intra-arterial administration of a replication-selective adenovirus (dl1520) in patients with colorectal carcinoma metastatic to the liver: a phase I trial." *Gene Ther* **8**(21): 1618-26.
- Reid, T., E. Galanis, et al. (2002). "Hepatic arterial infusion of a replication-selective oncolytic adenovirus (dl1520): phase II viral, immunologic, and clinical endpoints." *Cancer Res* **62**(21): 6070-9.
- Rip, J., M. C. Nierman, et al. (2005). "Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: working toward clinical application." *Hum Gene Ther* **16**(11): 1276-86.
- Rochlitz, C., R. Figlin, et al. (2003). "Phase I immunotherapy with a modified vaccinia virus (MVA) expressing human MUC1 as antigen-specific immunotherapy in patients with MUC1-positive advanced cancer." *J Gene Med* **5**(8): 690-9.
- Rosengart, T. K., L. Y. Lee, et al. (1999). "Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease." *Circulation* **100**(5): 468-74.
- Roth, J. A., D. Nguyen, et al. (1996). "Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer." *Nat Med* **2**(9): 985-91.
- Sandmair, A. M., S. Loimas, et al. (2000). "Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses." *Hum Gene Ther* **11**(16): 2197-205.
- Saulnier, P., M. Vidaud, et al. (2003). "Development and validation of a real-time PCR assay for the detection and quantitation of p53 recombinant adenovirus in clinical samples from patients treated with Ad5CMV-p53 (INGN 201)." *J Virol Methods* **114**(1): 55-64.
- Scholl, S. M., J. M. Balloul, et al. (2000). "Recombinant vaccinia virus encoding human MUC1 and IL2 as immunotherapy in patients with breast cancer." *J Immunother* **23**(5): 570-80.
- Schuler, M., R. Herrmann, et al. (2001). "Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: results of a multicenter phase II study." *J Clin Oncol* **19**(6): 1750-8.
- Schuler, M., C. Rochlitz, et al. (1998). "A phase I study of adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with advanced non-small cell lung cancer." *Hum Gene Ther* **9**(14): 2075-82.
- Senzer, N., S. Mani, et al. (2004). "TNFerade biologic, an adenovector with a radiation-inducible promoter, carrying the human tumor necrosis factor alpha gene: a phase I study in patients with solid tumors." *J Clin Oncol* **22**(4): 592-601.
- Shand, N., F. Weber, et al. (1999). "A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. GLI328 European-Canadian Study Group." *Hum Gene Ther* **10**(14): 2325-35.
- Simek, S. (2003). Opmerking genoteerd onder Overview op pag. 40 van "The ICH6 report", downloaden via [www.ich.org](http://www.ich.org) onder ICH6 conference. The Sixth International Conference on Harmonisation of Technical Requirements, Osaka, Japan.
- Simons, J. W., E. M. Jaffee, et al. (1997). "Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer." *Cancer Res* **57**(8): 1537-46.

- Singh, S., C. Cunningham, et al. (2001). "Toxicity assessment of intratumoral injection of the herpes simplex type I thymidine kinase gene delivered by retrovirus in patients with refractory cancer." *Mol Ther* **4**(2): 157-60.
- Smitt, P. S., M. Driesse, et al. (2003). "Treatment of relapsed malignant glioma with an adenoviral vector containing the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir." *Mol Ther* **7**(6): 851-8.
- Sobol, R. E., D. L. Shawler, et al. (1999). "Interleukin 2 gene therapy of colorectal carcinoma with autologous irradiated tumor cells and genetically engineered fibroblasts: a Phase I study." *Clin Cancer Res* **5**(9): 2359-65.
- Sterman, D. H., K. Molnar-Kimber, et al. (2000). "A pilot study of systemic corticosteroid administration in conjunction with intrapleural adenoviral vector administration in patients with malignant pleural mesothelioma." *Cancer Gene Ther* **7**(12): 1511-8.
- Sterman, D. H., J. Treat, et al. (1998). "Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy: results of a phase I clinical trial in malignant mesothelioma." *Hum Gene Ther* **9**(7): 1083-92.
- Stewart, A. K., N. J. Lassam, et al. (1999). "Adenovector-mediated gene delivery of interleukin-2 in metastatic breast cancer and melanoma: results of a phase I clinical trial." *Gene Ther* **6**(3): 350-63.
- Stone, D., S. Ni, et al. (2005). "Development and assessment of human adenovirus type 11 as a gene transfer vector." *J Virol* **79**(8): 5090-104.
- Tait, D. L., P. S. Obermiller, et al. (1999). "Ovarian cancer BRCA1 gene therapy: Phase I and II trial differences in immune response and vector stability." *Clin Cancer Res* **5**(7): 1708-14.
- Tait, D. L., P. S. Obermiller, et al. (1997). "A phase I trial of retroviral BRCA1sv gene therapy in ovarian cancer." *Clin Cancer Res* **3**(11): 1959-68.
- Tong, A. W., J. Nemunaitis, et al. (2005). "Intratumoral injection of INGN 241, a nonreplicating adenovector expressing the melanoma-differentiation associated gene-7 (mda-7/IL24): biologic outcome in advanced cancer patients." *Mol Ther* **11**(1): 160-72.
- Trask, T. W., R. P. Trask, et al. (2000). "Phase I study of adenoviral delivery of the HSV-tk gene and ganciclovir administration in patients with current malignant brain tumors." *Mol Ther* **1**(2): 195-203.
- Trudel, S., J. Trachtenberg, et al. (2003). "A phase I trial of adenovector-mediated delivery of interleukin-2 (AdIL-2) in high-risk localized prostate cancer." *Cancer Gene Ther* **10**(10): 755-63.
- Tursz, T., A. L. Cesne, et al. (1996). "Phase I study of a recombinant adenovirus-mediated gene transfer in lung cancer patients." *J Natl Cancer Inst* **88**(24): 1857-63.
- van Baren, N., M. C. Bonnet, et al. (2005). "Tumoral and Immunologic Response After Vaccination of Melanoma Patients With an ALVAC Virus Encoding MAGE Antigens Recognized by T Cells." *J Clin Oncol*.
- van der Linden, R. R., B. L. Haagmans, et al. (2005). "Virus specific immune responses after human neoadjuvant adenovirus-mediated suicide gene therapy for prostate cancer." *Eur Urol* **48**(1): 153-61.
- Vasey, P. A., L. N. Shulman, et al. (2002). "Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer." *J Clin Oncol* **20**(6): 1562-9.
- Wagner, J. A., A. H. Messner, et al. (1999). "Safety and biological efficacy of an adeno-associated virus vector-cystic fibrosis transmembrane regulator (AAV-CFTR) in the cystic fibrosis maxillary sinus." *Laryngoscope* **109**(2 Pt 1): 266-74.
- Wagner, J. A., I. B. Nepomuceno, et al. (2002). "A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies." *Hum Gene Ther* **13**(11): 1349-59.
- Wang, F., D. K. Patel, et al. (2003). "Development of an adenovirus-shedding assay for the detection of adenoviral vector-based vaccine and gene therapy products in clinical specimens." *Hum Gene Ther* **14**(1): 25-36.
- Wolf, J. K., D. C. Bodurka, et al. (2004). "A phase I study of Adp53 (INGN 201; ADVEXIN) for patients with platinum- and paclitaxel-resistant epithelial ovarian cancer." *Gynecol Oncol* **94**(2): 442-8.
- Ye, X., G. P. Gao, et al. (1998). "Evaluating the potential of germ line transmission after intravenous administration of recombinant adenovirus in the C3H mouse." *Hum Gene Ther* **9**(14): 2135-42.
- Zabner, J., B. W. Ramsey, et al. (1996). "Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis." *J Clin Invest* **97**(6): 1504-11.
- Zuckerman, J. B., C. B. Robinson, et al. (1999). "A phase I study of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to a lung segment of individuals with cystic fibrosis." *Hum Gene Ther* **10**(18): 2973-85.

## 9.2 *Afkortingenlijst*

AAV	Adeno-associated Virus
Ad	Adenovirus
ADA	Adenosine deaminase
ALVAC	Recombinant canarypox virus
AMC	Academisch Medisch Centrum Amsterdam
AMT	Amsterdam Molecular Therapeutics
BAL	Broncho-alveolaire lavage
BGGO	Bureau Genetisch Gemodificeerde Organismen
bp	basenparen
CBER	Center for Biologics Evaluation and Research
CBG	College ter beoordeling van Geneesmiddelen
CCMO	Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek
cDNA	copy DNA
CFTR	cystic fibrosis transmembraan conductance regulator
CFU	Colony Forming Units
COGEM	Commissie Genetische Modificatie
CPE	Cytopatisch Effect
CRAAd	Conditioneel Replicerend Adenovirus
CRO	Contract Research Organization
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
EDTA	Ethyleen Diamine Tetra Acetic acid
EFPIA	European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations
EFTA	European Free Trade Association
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Evaluation Agency
EMA-CHMP	Comite voor geneesmiddelen voor menselijk gebruik
EMA-GTWP	EMA Gene Therapy Working Party
EU	Europese Unie
EUFETS	The European Institute for Research and Development of Transplantation Strategies
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluorescence In-Situ Hybridization
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GAPDH	glyceraldehyde-3-fosfaat dehydrogenase
gc	genoom kopieën
GTAC	Gene Therapy Advisory Committee
HIV	Humaan Imuundeficiency Virus
HSC	Health Science Council
HSV	Herpes Simplex Virus
IAVI	International AIDS Vaccine Initiative
ICH	International Conference on Harmonisation
ICH-GTDG	Gene Therapy Discussion Group
IFPMA	International Federation of Pharmaceutical Manufacturers Association
IGZ	Inspectie Gezondheidszorg
IU	Internationale Unit
JPMA	Japan Pharmaceutical Manufacturers Association
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Limit Of Quantification

LREC	Local Ethics Research Committee
LUMC	Leids Universitair Medisch Centrum
MCA	Medicines Control Agency
MDR	Multiple Drug Resistance
METC	Medisch Ethische Toetsings Commissie
MHLW	Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan
MolMed	Molecular Medicine
NB	Niet Bekend
NDDO Oncology	Navigator in Oncology Drug Development
NIH-OBA	National Institutes of Health Office of Biotechnology Activities
non-qPCR	niet kwantitatieve PCR
NVGT	Nederlandse Vereniging voor Gentherapie
nvt	niet van toepassing
P.I.	Principal Investigator
PAFSC	Pharmaceutical Affairs and Food Safety Council
PBMC	Perifeer Bloed Mononucleaire Cellen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFU	Particle Forming Unit
PhRMA	Pharmaceutical Research and Manufacturers of America
qPCR	kwantitatieve PCR
RAC	Recombinant DNA Advisory Committee
RCA	Replicatie Competent Adenovirus
RCR	Replicatie Competent Retrovirus
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
RNA	Ribo Nucleic Acid
RRE	<i>rev</i> -responsive element
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
s.c.	subcutaan
SCID	Severe Combined Immuno Deficiency
SFDA	Chinese State Food and Drug Administration
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TK	Thymidine Kinase
TNF- $\alpha$	Tumor necrose factor
TU	Transducing Unit
UMC Utrecht	Universitair Medisch Centrum Utrecht
UMCG	Universitair Medisch Centrum Groningen
VEGF	vascular epithelial growth factor
VP	Virus Partikels
VPC	Vector Producerende Cellen
VROM	Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieu
VUmc	Vrije Universiteit medisch centrum
WHO	World Health Organization

### **9.3 *Lijst van benaderde personen***

Dr. G. Akita  
Genzyme Corporation, Framingham, Verenigde Staten

Prof.dr. C.H. Bangma  
Afdeling Urologie, Erasmus MC, Rotterdam

Dr. A. Chadder  
BioReliance, Stirling, Schotland, Engeland

Prof.dr. M.K. Brenner  
Baylor College of Medicine, Center for Cell and Gene Therapy, Houston, Verenigde Staten

Dr. A. Byrnes  
Division of Cellular and Gene Therapies, FDA, Rockville, Verenigde Staten

Dr. G.J.J. van Doornum  
Afdeling Virologie, Erasmus MC, Rotterdam

Dr. S. Ebeling  
Afdeling Hematologie, UMC Utrecht

Dr. D. Galbraith  
Covance Inc., Harrogate, North Yorkshire, Engeland

Dr. W.R. Gerritsen  
Afdeling Interne Oncologie, VUmc Cancer Center Amsterdam

Prof.dr. H.J. Haisma  
Afdeling Therapeutische Genmodulatie, UMCG, Groningen

Dr. G.A.P. Hospers  
Afdeling Interne Oncologie, UMCG, Groningen

Dr. S. Janaindunsingh  
MicroSafe B.V., Leiden

Dr. Ursula Jenal  
Jenal & Partners Biosafety Consulting, Basel, Zwitserland

Dr. M.J.H. Kenter  
CCMO, Den Haag

Dr. W.H.J. Kruit  
Afdeling Interne Oncologie, Erasmus MC, Rotterdam

Dr. K. Kühlcke  
Department of Gene Therapy, EUFETS AG, Idar-Oberstein, Duitsland

Dr. P. Logan  
Health Safety Executive, Engeland

Dr. Andreas Marti  
Gene Therapy Clinical Trials and Products, Swissmedic, Bern, Zwitserland

Dr. M.C. McIntyre  
Division of Cellular and Gene Therapies, FDA, Rockville, Verenigde Staten

Dr. J.J.M. Meulenberg  
Amsterdam Molecular Therapeutics B.V., Amsterdam

Dr. C.H.J. Lamers  
Afdeling Interne Oncologie  
Erasmus MC-Daniel den Hoed kliniek, Rotterdam

Dr. R.H.W. Lorijn  
Amsterdam Molecular Therapeutics B.V., Amsterdam

Prof.dr. Y. Nasu  
Department of Urology, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry,  
Japan

H. Ovelgönne  
RIVM, Bilthoven

Dr. N. Patel  
Genvec Inc., Gaithersburg, Verenigde Staten

Drs. J.J. de Poorter  
Afdeling Orthopedie, LUMC, Leiden

Dr. L.W. Seymour  
Department of Clinical Pharmacology, Radcliffe Infirmary, University of Oxford, Engeland

Prof.dr. P.A.E. Sillevs Smitt  
Afdeling Neurologie, Erasmus MC, Rotterdam

Prof.dr. T. Tötterman  
Clinical Immunology Division, Rudbeck Laboratory, Uppsala University, Sweden

Prof.dr. D. Valerio  
Crucell NV, Leiden

## 9.4 Literatuur studie klinische genterapie studies

Ziekte en Gen	Wijze en aantal toedieningen	Dosis	Type shedding assay	Karakteristieken assay	Geteste monsters	Tijdstip shedding analyse	Shedding data	Referentie
<b>RETROVIRUS</b>								
kiemcellumoren; MDR-1*	i.v.; eenmalig	3,5x10 <sup>6</sup> cellen/kg	extended PG4S+L-assay	-	plasma	-	geen RCR gedetecteerd	(Abonour, Williams et al. 2000)
HIV; anti-HIV ribozyme*	i.v.; eenmalig	gemiddeld 3,2±1,1x10 <sup>6</sup> CD34 <sup>+</sup> cellen/kg	non-qPCR	detectiegrens: 1 pos cel in 10 <sup>5</sup> cellen	PBMC	6mnd, 1y na inj.	geen RCR gedetecteerd	(Amado, Mitsuyasu et al. 2004)
borstca. en melanoma; cytochrome P450 2B6	i.t.; 2x met 24 uur ertussen	8x10 <sup>5</sup> – 8x10 <sup>7</sup> transferring units/ml	qPCR	-	sk, PBMC, plasma,	sk; 24h na elke inj., bloed; pre., 1h,4h en 24h.	sk;1/6: pos (2 transferring units/ml), bloed; 4/6 1h, 1/6 4h, na 24h geen shedding gedetecteerd	(Braybrooke, Slade et al. 2005)
ziekte van Gaucher; glucocerebrosidase*	i.v.; eenmalig	0,59-6,0x10 <sup>6</sup> cellen/kg	non-qPCR	detectiegrens: ≥10 RCR in 0,5x10 <sup>6</sup> cellen met 99,9% zekerheid	bloed	pre, 0-1, 10d, 1, 2,3,6,10,12mnd	geen RCR gedetecteerd	(Dunbar, Kohn et al. 1998)
beenmergtransplantatie bij borstca., ovariumca. en glioblastoma; MDR*	i.v.; eenmalig	1,6-14x10 <sup>7</sup> cellen	extended PG4S+L-assay	-	bloed	2wk, 4wk, 3,6 en 9mnd	geen RCR gedetecteerd	(Hesdorffer, Ayello et al. 1998)
oppervlakkige tumoren of oppervlakkige metastasen van tumoren elders in lichaam; IL-12 (p35/p40) en neo*	i.t.; 4x met 7 dagen interval	300, 1000, 3000 en 5000 ng/24h gesecreteerde IL-12 dosis	marker rescue assay	-	serum	-	geen RCR gedetecteerd	(Kang, Park et al. 2001)
<sup>a</sup> melanoma; HSV-1-TK	i.t.; 1-3 injecties	1x10 <sup>8</sup> -3x10 <sup>9</sup> cellen/ml	non-qPCR	detectiegrens: 1-3 pos cellen/500 ng DNA	PBMC	0h, 1h, 7d, 14d en 21d	1/7 monsters 1h na injectie was zwak pos. Op latere tijdstippen was zelfde pt neg	(Klatzmann, Cherin et al. 1998)
<sup>a</sup> glioblastoma; HSV-1-TK	i.t.; eenmalig	7,1-9,8x10 <sup>6</sup> cellen/cm <sup>2</sup>	non-qPCR	detectiegrens: 1-3 pos cellen/500 ng DNA	PBMC	0h, 1h, 7d, 14d en 21d	PBMC: 1/7 monsters 1h na injectie was zwak pos. Op latere tijdstippen was zelfde pt neg	(Klatzmann, Valery et al. 1998)
HIV; rev-responsive element (RRE) decoy*	i.v.; eenmalig	0,05-1x10 <sup>6</sup> cellen/kg	-	-	PBMC	-	geen RCR gedetecteerd	(Kohn, Bauer et al. 1999)



Ziekte en Gen	Wijze en aantal toedieningen	Dosis	Type shedding assay	Karakteristieken assay	Geteste monsters	Tijdstip shedding analyse	Shedding data	Referentie
chronische granulomateuze ziekte; p47 <sup>phox</sup> *	i.v.; tweemaal	0,1-4,7x10 <sup>6</sup> cellen/kg in totaal	PCR	-	PBMC	1, 3, 6 en 9 mnd	geen RCR gedetecteerd	(Malech, Maples et al. 1997)
gemetastaseerd melanoom en niercelcarcinoom; NeoR*	i.v.; eenmalig	4-92x10 <sup>9</sup> cellen	non-qPCR	-	bloed	periodiek tot 8 w	geen RCR gedetecteerd	(Merrouche, Negrier et al. 1995)
<sup>b</sup> HIV; CD4-zeta*	i.v.; eenmalig	2-3x10 <sup>10</sup> cellen	qPCR	detectiegrens: 7 kopieën/10 <sup>6</sup> cellen	PBMC	-	geen RCR gedetecteerd tot 1 jaar na toed. getransduceerde T cellen	(Mitsuyasu, Anton et al. 2000)
melanoma; IFN-γ	i.t.; 1 cyclus van 5 d (1dd toediening) voor 1 <sup>e</sup> 9 patiënten, 2 <sup>e</sup> 8 patiënten 6 maal cyclus van 5d	0,3-1,0x10 <sup>7</sup> PFU/dag	non-qPCR	-	PBMC	-	geen RCR gedetecteerd	(Nemunaitis, Fong et al. 1999)
recidief maligne hersentumor; HSV-TK1	i.t.; eenmalig	1x10 <sup>7</sup> -1x10 <sup>8</sup> cellen/ml	non-qPCR	-	PBMC	-24h en dag 28	21/52 monsters na behandeling zijn positief voor vector DNA. Geen RCR gedetecteerd	(Packer, Raffel et al. 2000)
hemofilie A; B-domain deleted human factor VIII (hFVIII)	i.v.; 3dagen 1dd	Totale dosis: 2,8x10 <sup>7</sup> -8,8x10 <sup>8</sup> TU/kg	PCR	detectiegrens: 1 kopie/1,5x10 <sup>5</sup> diploïd cel genoom	PBMC, sem	PBMC: pre, 6 en 12 mnd sem: pre, 2, 6, 9, 11, 17, 29 en 53wk.	PBMC: geen RCR gedetecteerd. sem: 9wk, 1 pos monster van voorbijgaande aard.	(Powell, Ragni et al. 2003)
<sup>a</sup> recidief glioblastoma multiforme; HSV-TK	i.t.; tweemaal	0,8-1,2x10 <sup>9</sup> VPC	PCR	-	PBMC	pre, 0, 14, 41d, 5, 7, 9, 12, 15mnd	14/148 monsters pos voor vector DNA in 11/30 pt. Geen RCR gedetecteerd	(Prados, McDermott et al. 2003)
<sup>c</sup> glioblastoma multiforme; HSV-TK	i.t.; eenmalig	1x10 <sup>8</sup> cellen/ml	PCR, marker rescue assay(RCR)	qPCR: detectiegrens: 10 pos cellen in 0,5x10 <sup>6</sup> PBMC, met 99,99% detectie zekerheid Marker rescue assay: detectiegrens: 50 pos cellen/1x10 <sup>6</sup> PBL	PBL, Gonadaal weefsel (8♂ en 4♀)	-	PBMC: 9/121 pos op 28d Geen RCR gedetecteerd. Gonadaal weefsel: geen aanwezigheid van vector DNA	(Rainov 2000)
recidief maligne hersentumoren; HSV-TK	i.t.; eenmalig	1x10 <sup>8</sup> VPC/10ml	non-qPCR	-	PBMC	6-7d en daarna met intervallen	geen vector DNA of RCR gedetecteerd	(Ram, Culver et al. 1997)
kleincellig longcarcinoom; wild-type p53	i.t.; eenmalig	5x10 <sup>7</sup> CFU	non-qPCR	detectiegrens: 1 kopie in 10 <sup>5</sup> genomisch DNA	lymfocyten, sp	Geregeld tot 3 mnd na toediening	geen virale sequenties gedetecteerd	(Roth, Nguyen et al. 1996)
maligne glioma; HSV-TK	i.t.; eenmalig	10 <sup>9</sup> cellen/ 10 ml	non-qPCR	PCR detectiegrens: 5 provirussen in 1,2 µg chromosomaal DNA	plasma, u	pre, 3, 5, 7 en 21d	geen virale vectoren gedetecteerd	(Sandmair, Loimas et al. 2000)

Ziekte en Gen	Wijze en aantal toedieningen	Dosis	Type shedding assay	Karakteristieken assay	Geteste monsters	Tijdstip shedding analyse	Shedding data	Referentie
<sup>b</sup> glioblastoma multiforme; HSV-TK	<i>i.t.</i> ; eenmalig	10 <sup>8</sup> cellen/ml	PCR, marker rescue assay (RCR)	-	PBL, Gonadaal weefsel (7♂ en 7♀)	2 en 5wk, 2, 4, 10, 12mnd, daarna jaarlijks	17 pt testen ten minste 1 maal pos voor vector DNA. (8/24 pt pos op 14d, 8/46 pt pos op 28d) Geen RCR gedetecteerd Gonadaal weefsel: geen aanwezigheid van vector DNA	(Shand, Weber et al. 1999)
niercelcarcinoom; GM-CSF*	<i>i.d.</i> ; multipel	1x10 <sup>6</sup> -4x10 <sup>7</sup> cellen	-	-	bloed	pre, 1d, 1,2,3,6,9,12, daarna jaarlijks	geen RCR gedetecteerd	(Simons, Jaffee et al. 1997)
melanoma, borstkanker, sarcoma, kleincellig longkanker; HSV-TK	<i>i.t.</i> ; 5 dagen 1dd	0,2x10 <sup>7</sup> CFU	non-qPCR	-	serum	pre, 12w	geen RCR gedetecteerd	(Singh, Cunningham et al. 2001)
colorectaal carcinoom; interleukine-2*	<i>s.c.</i> ; minimaal 3 toedieningen	100-800 units IL-2/24 uur	non-qPCR	-	PBMC	pre, 4 en 8w en daarna elke 3 mnd	geen RCR gedetecteerd	(Sobol, Shawler et al. 1999)
<sup>a</sup> ovariumcarcinoom; BRCA1 en LXS- BRCA1sv	<i>i.p.</i> ; 3 cycli van 4d met 4 wk interval	1,1-3,3x10 <sup>9</sup> VP/dag	non-qPCR	-	PBMC, plasma	pre, binnen 24h	PBMC: 5/65 monsters pos plasma: geen vector detecteerbaar	(Tait, Obermiller et al. 1997; Tait, Obermiller et al. 1999)
<b>ADENOVIRUS</b>								
<b>Replicatie deficiënt adenovirus</b>								
cystische fibrose; CFTR	inhalatie; eenmalig	1x10 <sup>5</sup> -5,4x10 <sup>8</sup> pfu	viruskweek, non-qPCR	-	kweek: nu, bloed, f, u, sp, BAL, ku PCR: nu, ku, BAL	kweek: 1,3,7,14,21,28d PCR: 0,1,2,3,4,7,9,14,21d	kweek: geen infectieus virus gedetecteerd. PCR: tot 21d viraal DNA bij alle patiënten gedetecteerd in nu, ku, sp en BAL. In 1 pt viraal DNA gedetecteerd in bloed en u na 48h.	(Bellon, Michel-Calemard et al. 1997)
<sup>a</sup> recidief ovariumcarcinoom; recombinant, wildtype p53 (SCH 58500)	<i>i.p.</i> ; eenmalig	7,5x10 <sup>10</sup> -7,5x10 <sup>13</sup> VP	qPCR, ELISA	-	PCR: ser; ELISA: u, f	serum: pre, 1,2,4,6,12,24,36,48,72h en 7,14,21,28d; u en f: pre en tijdens toediening, bij ontslag uit zkh	PCR: 7/17 pt vector detecteerbaar, in 4 niet kwantificeerbaar. Bij 1 pt na 24h kwantificeerbaar niveau van vector; ELISA: geen vector gedetecteerd.	(Buller, Runnebaum et al. 2002)

Ziekte en Gen	Wijze en aantal toedieningen	Dosis	Type shedding assay	Karakteristieken assay	Geteste monsters	Tijdstip shedding analyse	Shedding data	Referentie
plaveiselcelca. van hoofd en hals; p53	i.t.; 1-6 toedieningen	$10^6$ - $10^{11}$ pfu	viruskweek en non-qPCR	viruskweek; detectiegrens: 10 pfu/0,5 ml monster PCR; detectiegrens: $10^3$ pfu/0,5ml monster	u, bloed, ku, sp	tijdstippen worden niet specifiek genoemd.	kweek: bij hoogste dosis infectieus virus in bloed gedetecteerd 30m na toediening, na 48h geen detectie van infectieus virus. Bij hoogste dosis was in u en sp gedurende gehele cyclus van toediening infectieus virus detecteerbaar. 3-17d na laatste toediening was in u geen infectieus virus niet meer detecteerbaar., voor sp was dit 7d. Hoogste titer gedetecteerd in u en sp: $10^6$ pfu/0,5ml (bij hoogste dosis vector)	(Clayman, el-Naggar et al. 1998)
<i>cystische fibrose; CFTR</i>	<i>inhalatie en intranasaal; eenmalig</i>	$2 \times 10^9$ - $2 \times 10^9$ pfu	?	-	<i>nu, ku, f, bloed en u</i>	-	<i>geen shedding gedetecteerd</i>	<i>(Crystal, McElvaney et al. 1994)</i>
melanoma en borstkanker; wild-type p53	i.t.; eenmalig	$2 \times 10^7$ - $5 \times 10^8$ pfu	ELISA, viruskweek met FACS assay	ELISA: monster positief als de ratio van de mean optical densities (OD) boven de drempel waarde van 0,28 uitkomt	ELISA: u, f Viruskweek met FACS: ser, nu, u, f	pre en 48h na toediening	in alle monsters werd geen shedding gedetecteerd	(Dummer, Bergh et al. 2000)
non-hodgkin lymfoom; IFN- $\gamma$	i.t.; 4 cycli van 3 wekelijkse injecties	$3 \times 10^9$ - $3 \times 10^{11}$ VP	qPCR	-	plasma, u	plasma: pre, 1-2h na elke injectie en aan eind van studie. urine: pre, 2-4h en aan eind van studie	plasma: na 1-2h bij 4/9 pt vector detecteerbaar, na 8d 2/9 pt pos, bij 15d geen shedding detecteerbaar. u: geen shedding gedetecteerd.	(Dummer, Hassel et al. 2004)
maligne glioma; HSV-TK	i.t.; eenmalig	$2,5 \times 10^{11}$ - $5,6 \times 10^{12}$ VP	viruskweek en non-qPCR	-	nu, u, bloed	1,3,5,7d, 2,4,6,8,12, 16,20, 24w	geen shedding gedetecteerd	(Germano, Fable et al. 2003)
*kanker in de tractus digestivus; IL-2	i.t.; eenmalig	$10^7$ - $10^9$ PFU	viruskweek en PCR	-	bloed, u	15m, 1,2,4,7d	bloed: vector gedetecteerd 15m na toediening bij alle pt., verdere monsters waren negatief	(Gilly, Sayag-Beaujard et al. 1998; Gilly, Beaujard et al. 1999)
stabiele angina pectoris; FGF	intracoronair; eenmalig	$3,3 \times 10^8$ - $10^{11}$ VP	viruskweek, PCR (sem)	viruskweek; detectiegrens: 250 IU/ml kwantificeringsgrens: 1000 IU/ml PCR: -	bloed, u, sem (PCR)	bloed, u: 1h, 1,2,4, 8,12w, 6,12mnd sem: 8w	bloed:virus gedetecteerd in alle pt monsters 1h na toediening, verdere monsters neg. u: geen virus gedetecteerd. sem: geen viraal DNA gedetecteerd	(Grines, Watkins et al. 2002)

Ziekte en Gen	Wijze en aantal toedieningen	Dosis	Type shedding assay	Karakteristieken assay	Geteste monsters	Tijdstip shedding analyse	Shedding data	Referentie
longkanker; $\beta$ -galactosidase of IL-2	intrabronchiaal; eenmalig	$10^7$ - $10^9$ PFU	non-qPCR	detectiegrens: 2,5 kopieën viraal DNA	PBL, plasma, f, ku, BAL, u	Veel variable afname tijdstippen	PBL: 16/21 monsters pos direct na toed., 2 monsters pos na 4d plasma: 8/9 monsters pos direct na toed. 3pt pos tot max 7d na toed. ku: 2 monsters pos. BAL: 5m na toed bij alle pt pos. tot max 90d f: 4/21 pos tot max 4d u: geen shedding gedetecteerd	(Griscelli, Opolon et al. 2003)
cystische fibrose; CFTR	inhalatie; driemaal	$3 \times 10^6$ - $2 \times 10^9$ PFU	viruskweek	-	nu, ku, f, bloed, u	Dag 1-3	geen shedding van replicatie-deficiënt of replicatie-competent adenovirus aangetoond in totaal 345 monsters	(Harvey, Leopold et al. 1999)
gezonde vrijwilligers; cytosine deaminase	i.d.; tweemaal	$8 \times 10^7$ - $8 \times 10^9$ PU	non-qPCR	-	huid	pre, 3,28d	op 3d alle monsters pos voor vector DNA. Op 28d vector DNA gedetecteerd in alle monsters, behalve van de laagste dosis ( $8 \times 10^7$ )	(Harvey, Worgall et al. 1999)
recidief ovariumca.; HSV-TK	i.p.; eenmalig	$2 \times 10^{10}$ - $2 \times 10^{13}$ VP	PCR	-	u	pre, daarna dagelijks tot 3 analyses neg.	in 4pt viraal DNA gedetecteerd 2-5d na toediening. In 1 monster viraal DNA gedetecteerd 12d na toediening	(Hasenburg, Tong et al. 2000)
ischemisch hartfalen; VEGF	intracoronair; eenmalig	$2 \times 10^{10}$ pfu	PCR	-	ser, u	2d	geen shedding gedetecteerd	(Hedman, Hartikainen et al. 2003)
prostaatkanker; HSV-TK	i.t.; eenmalig	$1 \times 10^8$ - $1 \times 10^{11}$ IU	viruskweek, non-qPCR	detectiegrens PCR: 10-100 VP/ml urine	ser,sp (viruskweek) u (PCR) sem (1 monster, PCR)	dagelijks	viruskweek: alle monsters neg. PCR: $1 \times 10^8$ IU: alle pt neg $1 \times 10^9$ IU: 2/5pt pos alleen op dag 1 $1 \times 10^{10}$ IU: 3/4pt pos tot dag 11 $1 \times 10^{11}$ IU: 5/5pt pos tot dag 32 enige sem monster (dag 14) pos	(Herman, Adler et al. 1999)
maligne glioma; HSV-TK	i.t.; eenmalig	$3 \times 10^{10}$ pfu	qPCR	detectiegrens: 16 kopieën vector DNA	plasma, ser	pre, 1,2,4,7d	na 3d bij 2/17pt vector DNA gedetecteerd in plasma	(Immonen, Vapalahti et al. 2004)
cystische fibrose; CFTR	inhalatie; tweemaal	$8 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^{10}$ IU	viruskweek	detectiegrens: 10 IU/monster	sp, f, u, nu	pre, 1,2,3,4,7,14,21, 28d	geen shedding gedetecteerd	(Joseph, O'Sullivan et al. 2001)
melanoma; IFN- $\gamma$	i.t.; driemaal	$10^7$ - $10^{10}$ IU	viruskweek en PCR	-	bloed, u	bloed: pre, 1,24h, 36d u: pre, 6,24h, 36d	geen shedding gedetecteerd	(Khorana, Rosenblatt et al. 2003)
cystische fibrose; CFTR	intranasaal; eenmalig	$2 \times 10^7$ - $2 \times 10^{10}$ pfu	viruskweek en non-qPCR	-	u, nu, ku, f	20m, 1-8d	viruskweek: 1pt pos u op dag 1 en pos f op dag 1 en 2 PCR: vector DNA in nu gedetecteerd in 2 monsters (1d,4d). in ku 2 monsters pos na 2d	(Knowles, Hohneker et al. 1995)
blaaskanker; wild-type p53	i.t. of intravesicaal; eenmalig	$7,5 \times 10^{11}$ - $7,5 \times 10^{13}$ VP	ELISA, viruskweek	-	u	viruskweek: blaasirrigatie met in totaal 6 liter. ELISA: 24h	viruskweek: infectieus Ad gedetecteerd in $1^{\circ}$ 2-4 liter urine. Na 6 liter blaasirrigatie geen infectieus Ad gedetecteerd. ELISA: geen shedding gedetecteerd.	(Kuball, Wen et al. 2002)

Ziekte en Gen	Wijze en aantal toedieningen	Dosis	Type shedding assay	Karakteristieken assay	Geteste monsters	Tijdstip shedding analyse	Shedding data	Referentie
prostaatkanker; HSV-TK	i.t.; tweemaal	$2,5 \times 10^8$ - $2,5 \times 10^{10}$ pfu	viruskweek	-	ser, u	2,3,7,9,10d	u: 2 monsters pos op dag 2 ser: 3 monsters pos op dag 2 en 1 monster pos op dag 3	(Kubo, Gardner et al. 2003)
glioma; p53	i.t.; tweemaal	$3 \times 10^{10}$ - $3 \times 10^{12}$ VP	viruskweek en ELISA	-	plasma, sp, u, f	pre, 24h na 1 <sup>e</sup> toed. 24h, 2w, maandelijks na 2 <sup>e</sup> toed.	geen shedding gedetecteerd	(Lang, Bruner et al. 2003)
claudicatio intermittens; VEGF	i.a.; eenmalig	$2 \times 10^{10}$ pfu	PCR	-	bloed, u	2d	geen viraal DNA gedetecteerd	(Makinen, Manninen et al. 2002)
weke delen sarcoma; TNF- $\alpha$	i.t.; 1 <sup>e</sup> week: 2x/week, week 2-5: 1x/week	$4 \times 10^9$ - $4 \times 10^{11}$ PU	viruskweek	-	bloed, sp, u	pre, 2 w na complete behandeling	geen shedding gedetecteerd	(Mundt, Vijayakumar et al. 2004)
kleincellig longcarcinoom; p53	i.t.; eenmalig	$1 \times 10^6$ - $1 \times 10^{11}$ pfu	viruskweek en ELISA, PCR	detectiegrens viruskweek: 10 pfu/ml detectiegrens PCR: $10^3$ pfu/ml	plasma, u, sp (kweek+ ELISA) plasma (PCR)	plasma: pre, 30,60, 90m u, sp: pre, daarna dagelijks tot monsters neg.	plasma: 18/18 monsters pos na 30m in kweek en in PCR, dit nam af in de 60m daarna. u, sp: kweek pos in alle pt binnen 24h. Vector niet meer gedetecteerd na ongeveer 9d in beide monsters.	(Nemunaitis, Swisher et al. 2000)
leverkanker; nitroreductase	i.t.; eenmalig	$10^8$ - $5 \times 10^{11}$ VP	ELISA, qPCR	ELISA: detectiegrens: $2 \times 10^5$ VP/ml	plasma, ku, u, f	ELISA: pre, dagelijks tot monsters neg. PCR: pre., direct na toed., 30m, 1,2,4,8,24h	ELISA: geen virus gedetecteerd tot 24h na toed. PCR: vector DNA gedetecteerd binnen 30m na toed., afnemend tot niet detecteerbaar in 8-24h	(Palmer, Mautner et al. 2004)
cystische fibrose; CFTR	intralobair of inhalatie; eenmalig	$8 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^{10}$ IU	non-qPCR	-	BAL	2,7d	intralobair: 4/5pt pos na 2d, 1/3pt pos na 7d inhalatie: 13/13pt pos na 2d, 3/7pt pos na 7d	(Perricone, Morris et al. 2001)
<sup>b</sup> claudicatio intermittens; VEGF	i.m.; eenmalig	$4 \times 10^9$ - $4 \times 10^{10}$ PU	Viruskweek, PCR	-	plasma (PCR), u, ku (kweek)	kweek: 2w PCR: 24h	u, ku: alle pt neg plasma: 6/8 pt uit hoogste dosisgroep pos monster voor viraal DNA. Geen detecteerbaar viraal DNA bij pt uit andere dosisgroepen	(Rajagopalan, Mohler et al. 2003)
myocard ischemie; VEGF	intramyocardaal; eenmalig	$4 \times 10^8$ - $4 \times 10^{10}$ PU	-	-	nu, ku, u, bloed	pre, 2,4,7d	geen shedding gedetecteerd bij in totaal 305 monsters	(Rosengart, Lee et al. 1999)
maligne glioma; HSV-TK	i.t.; eenmalig	$3 \times 10^{10}$ pfu/10ml	non-qPCR	detectiegrens PCR: 5 provirus in 1,2 $\mu$ g chromosomaal DNA	plasma, u	pre, 3,5,7,21d	geen shedding gedetecteerd op enig moment	(Sandmair, Loimas et al. 2000)
kleincellig longcarcinoom; p53	i.t.; eenmalig	$10^7$ - $10^{10}$ PFU	ELISA	-	f, sp, u	pre, 72h of totdat negatief	1pt pos sp monster op dag 2 na toed.	(Schuler, Rochlitz et al. 1998)
<sup>b</sup> kleincellig longcarcinoom; p53	i.t.; eenmalig	$7,5 \times 10^{12}$ VP	ELISA, viruskweek en PCR	-	sp, f, u	pre, 1,2,3d	ELISA: 2/25pt Ad gedetecteerd in u. viruskweek: 1pt pos f monster ( $4,35 \times 10^4$ U/ml), bij PCR geen vector specifiek DNA aangetoond.	(Schuler, Herrmann et al. 2001)

Ziekte en Gen	Wijze en aantal toedieningen	Dosis	Type shedding assay	Karakteristieken assay	Geteste monsters	Tijdstip shedding analyse	Shedding data	Referentie
solide tumoren; TNF- $\alpha$	i.t.; wekelijks voor 6w	$4 \times 10^7$ - $4 \times 10^{11}$ PU	viruskweek	-	bloed, sp, u	pre en na laatste toediening	geen shedding gedetecteerd	(Senzer, Mani et al. 2004)
maligne glioma; HSV-TK	i.t.; eenmalig	$4,6 \times 10^8$ - $4,6 \times 10^{11}$ VP	viruskweek	-	nu, bloed, u, f, wondvocht	pre, daarna dagelijks tot negatief	geen shedding gedetecteerd	(Smitt, Driesse et al. 2003)
mesothelioom; HSV-TK	intrapleuraal; eenmalig	$1 \times 10^9$ - $1 \times 10^{12}$ pfu	viruskweek	-	f,u,ku,nu	1,3,5,7,14,19d	geen shedding gedetecteerd	(Sterman, Treat et al. 1998; Sterman, Molnar-Kimber et al. 2000)
<i>borstkanker, melanoma, prostaatkanker; IL-2</i>	<i>i.t.; eenmalig</i>	<i><math>10^7</math>-<math>10^{10}</math> pfu</i>	<i>viruskweek, non-qPCR</i>	<i>viruskweek; detectiegrens: 10 pfu PCR; detectiegrens <math>1,5 \times 10^3</math>-<math>1,5 \times 10^4</math> pfu</i>	<i>bloed, f, u, ku</i>	<i>pre, 24h en 7d</i>	<i>PCR: 1 bloed monster pos voor viraal DNA 24h na toed.</i>	<i>(Stewart, Lassam et al. 1999; Trudel, Trachtenberg et al. 2003)</i>
verschillende tumoren; melanoma-differentiation associated gene-7 (IL24)	i.t.; eenmalig (6 pt meerdere toedieningen)	$2 \times 10^{10}$ - $2 \times 10^{12}$ VP	qPCR	detectiegrens: 5000 kopieën/ml	plasma	30,60,90m,6,24,48,72h	na 30m in alle monsters piek in hoeveelheid DNA kopieën gedetecteerd, dit neemt af tot niet detecteerbaar in 72h.	(Tong, Nemunaitis et al. 2005)
hersentumoren; HSV-TK	i.t.; eenmalig	$2 \times 10^9$ - $2 \times 10^{12}$ VP	viruskweek, non-qPCR	viruskweek; detectiegrens; 20 pfu PCR; detectiegrens: 10 VP/ml urine	ser, nu, u	ser, nu, u: 1,2,4w u: dagelijks tot ontslag, 2,6w	geen shedding gedetecteerd middels kweek of PCR	(Trask, Trask et al. 2000)
longkanker; $\beta$ -galactosidase	i.t.; eenmalig	$10^7$ - $10^8$ pfu	viruskweek en non-qPCR	-	BAL, ku, sp, f, bloed	pre, daarna elke 2d tot negatief	BAL: alle monsters pos middels kweek, PCR pos tot 30d bloed: 3/6pt pos na 1d (PCR) sp: 3/6pt pos tot 11 d (PCR) ku: 1/6pt pos tot 11d (PCR)	(Tursz, Cesne et al. 1996)
ovariumkanker; p53	i.p.; dagelijks voor 5d, elke 3w	$3 \times 10^{10}$ - $3 \times 10^{12}$ VP	viruskweek	-	u,f,sp	1-6d,8,15,22d	geen shedding gedetecteerd	(Wolf, Bodurka et al. 2004)
cystische fibrose; CFTR	intranasaal; multipele toedieningen	$2 \times 10^7$ - $1 \times 10^{10}$ IU	viruskweek	detectiegrens: $10^3$ IU/ml	nu, sp, f, u	-	1pt pos nu 24h na toediening	(Zabner, Ramsey et al. 1996)
cystische fibrose; CFTR	intrabronchiaal; eenmalig	$2,1 \times 10^9$ - $2,1 \times 10^{11}$ VP	viruskweek	detectiegrens: 1 IU	u,sp, f, ku	pre, 1,2d	geen shedding gedetecteerd	(Zuckerman, Robinson et al. 1999)

Ziekte en Gen	Wijze en aantal toedieningen	Dosis	Type shedding assay	Karakteristieken assay	Geteste monsters	Tijdstip shedding analyse	Shedding data	Referentie
<b>Conditioneel replicerend adenovirus</b>								
prostaatca.; CV706	i.t.; eenmalig	$1 \times 10^{11}$ - $1 \times 10^{13}$ VP	qPCR en viruskweek	PCR; kwantificeringsgrens: 1300 kopieën/ml viruskweek; detectiegrens 50 pfu/ml	plasma (PCR), u (viruskweek)	plasma: pre, 30m, 1,4,8,12,18 en 24h, 3,8,14,28d u: 1,8,15,29d	PCR: 30m na toediening 14/16 pt pos., na 12-24h geen detectie. 2° piek in detectie van viraal DNA tussen 2-8d na toediening bij 13/16 pt pos. Bij 10/16pt werden hogere waarden gevonden dan tijdens 1° meting. Alle pt negatief 15d na toediening Viruskweek: 11/19 pt pos na 2d. 2/19 pt pos na 8d, na 15 en 29d alle pt neg.	(DeWeese, van der Poel et al. 2001)
prostaatca; HSV-TK	i.t.; eenmalig	$10^{10}$ - $10^{12}$ VP	non-qPCR en viruskweek	PCR; detectiegrens: 2 VP/ml bloed viruskweek; detectiegrens 100 IP/ml	u, bloed	1-9d, 1,2,3,6,9mnd en 1jaar na toediening	PCR: viraal DNA gedetecteerd direct na toediening in bloed bij alle pt (niet in laagste dosisgroep) Dit tot max 76d. Viruskweek: geen shedding gedetecteerd	(Freytag, Khil et al. 2002)
prostaatca; HSV-TK	i.t.; eenmalig	$10^{12}$ VP	non-qPCR en viruskweek	PCR; detectiegrens: 2 VP/ml bloed viruskweek; detectiegrens 100 IP/ml	bloed	dagelijks tot 2 metingen negatief, daarna 3,6,9,12,18, 24 mnd	viraal DNA gedetecteerd tot max 45d na toediening, geen infectieus virus gedetecteerd.	(Freytag, Stricker et al. 2003)
<sup>a</sup> sarcomen; ONYX-015	i.t.; 5 toedieningen/cyclus, 1-6 cycli	$5 \times 10^9$ - $5 \times 10^{10}$ PFU/cyclus	qPCR	detectiegrens: 500 VP/ml kwantificeringsgrens: 2000 VP/ml	bloed	dag 5 van de 1° cyclus voor 6 pt.	op dag 5 viraal DNA gedetecteerd bij 5/6 pt. Na een dip op dag 10 toename VP op dag 12 duidend op virale replicatie.	(Galanis, Okuno et al. 2005)
hoofd/hals kanker; ONYX-015	i.t.; eenmalig	$10^7$ - $10^{11}$ PFU	PCR, viruskweek	-	bloed (PCR), sk (viruskweek)	bloed: 0,3,8,15,22, 29d sk:pre en na 8d	geen shedding gedetecteerd	(Ganly, Kirn et al. 2000)
hepatocellulaire carcinoom; p53	1° dosis: i.v. 2° -5° dosis: i.t.	$3 \times 10^{11}$ PFU	non-qPCR	-	bloed	30m, 1, 4, 10,24h en 10d	na 30m viraal DNA detecteerbaar, na 4h geen detectie meer.	(Habib, Salama et al. 2002)
<sup>b</sup> colorectaal kanker; ONYX-015	i.v.; tweemaal	$2 \times 10^{12}$ VP	qPCR	detectiegrens: 500 VP/ml kwantificeringsgrens: 1000 VP/ml	plasma	1,3,6,24,48 en 72h	na 6h alle pt pos. na 24h 7pt pos (50%) na 72h 5pt pos. (36%)	(Hamid, Varterasian et al. 2003)
<sup>b</sup> verschillende tumoren; p53	i.t.; 5d 1 dosis per dag herhaald na 3wk	$5 \times 10^{11}$ VP	non-qPCR	detectiegrens: 100 VP/ $\mu$ l plasma	bloed	pre, 30m en 5, 22d na elke cyclus	6/16 pt pos 30m na toediening	(Lu, Zheng et al. 2004)
<sup>b</sup> hepatobilliare carcinomen; ONYX-015	i.t.(of i.p. bij maligne ascites; eenmalig	$6 \times 10^9$ - $3 \times 10^{10}$ pfu	viruskweek, non-qPCR	-	u, ascites, gal	1,2,3,4,5,6,7d	u: alle 55 monsters neg middels viruskweek gal: 2/2pt pos voor viraal DNA 1-5d na toed. ascites: 2/4pt pos kweek 1-6d na toed. 4/4pt pos voor viraal DNA 1-9d na toed.	(Makower, Rozenblit et al. 2003)
pancreascarcinoom; ONYX-015	i.t.; elke 4w tot tumor progressie	$10^8$ - $10^{11}$ pfu	qPCR		bloed	15m,24h,5d en 15d	na 15m 10/11 monsters pos voor viraal DNA. Monsters na 1,5,15d waren allen negatief voor viraal DNA	(Mulvihill, Warren et al. 2001)
gemetastaseerde solide tumoren;	i.v.; toediening op dag 1, 8 en 15 van	$2 \times 10^{10}$ - $2 \times 10^{13}$ VP	qPCR	detectiegrens: $1,05 \times 10^4$ VP/ml	plasma	7d	17/37monsters detecteerbaar vector genoom na 1° cyclus, 8/21 monsters pos na 2° cyclus	(Nemunaitis, Cunningham

ONYX-015	elke 3 wekelijkse cyclus			Kwantificerings-grens: 4,2x10 <sup>4</sup> VP/ml				et al. 2001)
<sup>b</sup> plaveiselcelca. van hoofd en hals; ONYX-015	i.t.; 1x/dag voor 5d of 2x/dag voor 2w en dit in 3 wekelijkse cycli	2x10 <sup>11</sup> VP	qPCR	detectiegrens: 1,05x10 <sup>4</sup> VP/ml kwantificerings-grens: 4,2x10 <sup>4</sup> VP/ml	plasma	24h na 5daagse toediening	24h na laatste toediening: 12/29 pt vector DNA detecteerbaar, 10d na toed. in 1 <sup>e</sup> cyclus: 2pt pos. geen monsters pos na 22d in elke cyclus en 15d na toed. vanaf cyclus 2. 24h na toed. in cyclus 2: 6/21pt detecteerbaar vector genoom en 2/8pt in cyclus 3. Na 2 cycli geen pos monsters meer gedetecteerd.	(Nemunaitis, Khuri et al. 2001)
verschillende typen gemetastaseerde carcinomen; ONYX-015	i.v.; 1x/week voor 6w	2x10 <sup>11</sup> -2x10 <sup>12</sup> VP	qPCR	detectiegrens: 1,05x10 <sup>4</sup> VP/ml kwantificerings-grens: 4,2x10 <sup>4</sup> VP/ml	plasma	30,90, 360m na de 1 <sup>e</sup> en 4 <sup>e</sup> toediening	viraal genoom gedetecteerd in grootste gedeelte van pt binnen 30m na toed, dit neemt af binnen 90m	(Nemunaitis, Cunningham et al. 2003)
<sup>c</sup> colorectalca.; ONYX-015	i.a.; tweemaal	2x10 <sup>8</sup> -2x10 <sup>12</sup> VP	qPCR	detectiegrens: 1,05x10 <sup>4</sup> VP/ml	bloed	5,10,30,60,90,120,180,360m	aanwezigheid van vector DNA verdwijnt binnen 6h na toediening	(Reid, Galanis et al. 2001; Reid, Galanis et al. 2002)
ovariumca.; ONYX-015	i.p.; 1x/dag voor 5d, 2 cycli	1x10 <sup>9</sup> -1x10 <sup>11</sup> pfu	non-qPCR	-	bloed	15m,1,6,12,24h	geen viraal DNA gedetecteerd	(Vasey, Shulman et al. 2002)
<b>ADENO-ASSOCIATED VIRUS</b>								
cystische fibrose; CFTR	inhalatie; eenmalig	10 <sup>10</sup> -10 <sup>13</sup> DRP	non-qPCR en viruskweek	PCR; detectiegrens: 1 vector kopie/10 <sup>4</sup> cellen viruskweek; detectiegrens: u: 100 RU/10μl monster f: 1000 RU/10μl monster	PBMC (PCR), sp, u, f	variabel per monster en per patiënt	PBMC: 1/12 pt pos voor viraal DNA f,u: geen shedding gedetecteerd sp: 7/12 pt pos na 1d, 1/12 pt pos op 7d na toediening	(Aitken, Moss et al. 2001)
cystische fibrose; CFTR	intranasaal; eenmalig	6x10 <sup>4</sup> -2x10 <sup>12</sup> DRP	non-qPCR en viruskweek	viruskweek; detectiegrens f: 1000 IU/10μl monster alle andere monsters 100 IU/10μl monster PCR; detectiegrens: 1 vector kopie/10 <sup>4</sup> cellen	sp, BAL, nu, u, f, bloed (alleen PCR)	viruskweek+PCR: pre, 1, 3, 7, 10d PCR: pre, 1,3,7,10, 30d	sp: 1pos monster op dag 1. In alle verdere monsters geen shedding gedetecteerd	(Flotte, Zeitlin et al. 2003)



Ziekte en Gen	Wijze en aantal toedieningen	Dosis	Type shedding assay	Karakteristieken assay	Geteste monsters	Tijdstip shedding analyse	Shedding data	Referentie
hemofilie B; coagulatie factor IX	i.m.; eenmalig	2x10 <sup>11</sup> vg/kg	non-qPCR	detectiegrens: 50 kopieën of vector sequenties in 1 µg DNA	ser, sp, u, f, sem	-	ser: pos voor vector sequenties 24 en 48h na toed., daarna neg. sp: pos 24h na toed., daarna neg. u: 1 monster pos 24h na toed., alle andere monsters neg. sem: alle monsters negatief (48,56, 59d na toed)	(Kay, Manno et al. 2000)
<sup>b</sup> cystische fibrose; CFTR	inhalatie; 3 maal	1x10 <sup>13</sup> DRP	viruskweek	detectiegrens: 100 IU/10µl monster	sp	0,14,60,75d	90% van de monsters op 0d pos (gem. waarde 7x10 <sup>5</sup> IU/ml na 14d geen shedding gedetecteerd	(Moss, Rodman et al. 2004)
cystische fibrose; CFTR	intranasaal; eenmalig	1x10 <sup>2</sup> -1x10 <sup>5</sup> RU	non-qPCR en viruskweek	nu: detectiegrens: 1000 RU/ml bloed: detectiegrens 1 vector sequentie/ 1000 cellen	nu, bloed	bloed: 1,7d sp: 1,7,14,28d	geen shedding gedetecteerd	(Wagner, Messner et al. 1999)
<sup>b</sup> cystische fibrose; CFTR	Intranasaal, eenmalig	100.000 RU	viruskweek	-	nu, f, u	1,7,14d	1 pt pos voor infectieus virus in nu op 7d (1d en 14d was neg)	(Wagner, Nepomuceno et al. 2002)
<b>ALVAC</b>								
<sup>a</sup> cytomegalovirus; CMV glycoprotein	i.m.; driemaal	10 <sup>3,5</sup> pfu	viruskweek	-	u, sp, bloed	u,sp: pre,0,7,28,35, 56,180,187,208d bloed: pre, 0,2,7,28, 30,35,56,180,182,187,208d	geen shedding gedetecteerd	(Adler, Plotkin et al. 1999)
<sup>b</sup> cervixcarcinoom; HPV-16 en HPV-18 E6 en E7**	i.d.; eenmalig	2,5x10 <sup>5</sup> pfu	viruskweek	-	huid	7,14,21d	geen shedding gedetecteerd	(Baldwin, van der Burg et al. 2003)
<sup>a</sup> cervixcarcinoom; HPV-16 en HPV-18 E6 en E7**	i.d.; eenmalig	10 <sup>8</sup> pfu	viruskweek en PCR	viruskweek: detectiegrens: 50pfu/ml voor natte monsters, 500 pfu/ml voor droge monsters	ku, genitaal, huid, korst op wond	pre, 0,1,3,5, 10-14d	virus wordt gedetecteerd in de korst op de wond van alle pt. In andere monsters wordt geen shedding gedetecteerd.	(Borysiewicz, Fiander et al. 1996)
HIV; gp160 envelop gen	i.d.; eenmalig	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup> pfu	viruskweek	-	huid	-	geen shedding gedetecteerd	(Cooney, Collier et al. 1991)
HIV negatieve vrijwilligers; HIV-1 envelop	i.m.; multipel	-	viruskweek	-	huid	3,7,10,14, daarna 2x per week totdat wond geheeld is	infectieus virus gedetecteerd op huid tot dag 15, uitstrijkjes genomen buiten het afdekkende wondgaas waren in alle gevallen negatief (154 monsters)	(Corey, McElrath et al. 1998)
HIV negatieve vrijwilligers; HIV-1 envelop	i.d.; tweemaal	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup> pfu/ml	viruskweek	-	huid	-	virus werd gedetecteerd na 2-5 dagen op de injectieplaats. De laatste dag van detectie van virus varieert van 6-26 dagen. Uitstrijkjes genomen aan de buitenkant van het afdekkende wondgaas waren allen negatief.	(Graham, Belshe et al. 1992)

maligne mesothelioom; IL-2**	i.t.; multipel	10 <sup>7</sup> pfu	viruskweek	-	sp, u, bloed	-	geen shedding gedetecteerd	(Mukherjee, Haenel et al. 2000)
solide tumoren; MUC1-IL2**	i.m.; multipel	5x10 <sup>6</sup> -10 <sup>8</sup> pfu	PCR, viruskweek (als PCR positief)	-	bloed, u	bloed: pre, 1h, 8d u: pre, 4h, 8d	Geen shedding gedetecteerd	(Rochlitz, Figlin et al. 2003)
<sup>a</sup> borstkanker; MUC1-IL2**	i.m.; eenmalig	5x10 <sup>5</sup> -5x10 <sup>7</sup> pfu	non-qPCR en viruskweek	viruskweek: detectiegrens 2-9 pfu/ml voor natte monsters, 150 pfu/ml voor droge monsters PCR: -	ku, nu, bloed, u, f	pre, 0, dagelijks totdat patient het ziekenhuis verlaat	Geen shedding gedetecteerd	(Scholl, Balloul et al. 2000)

*Schuin gedrukt staan de studies waarin naast de shedding analyse ook is gekeken naar het vrijkomen van replicatie competent virus.*

*Studies betreffen een Fase I studie tenzij anders aangegeven.*

*<sup>a</sup> Dit betreft een Fase I/II studie*

*<sup>b</sup> Dit betreft een Fase II studie*

*<sup>c</sup> Dit betreft een Fase III studie*

*\* ex vivo gentherapie; \*\* immunogentherapie*

*(-) deze informatie wordt niet in het artikel vermeld.*

*Afkortingen: BAL: broncho-alveolaire lavage, ca.: carcinoom, CFU: colony forming unit, CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, d: dagen, dd: per dag, DRP: DNase resistant partikels, f: faeces (ontlasting), FGF: fibroblast growth factor, GM-CSF: granulocyt-macrophage colony-stimulating factor, h: hour (uur), HIV: human immunodeficiency virus, HSV: herpes simplex virus, i.a.: intra-arterieel, i.d.: intradermaal, IFN-γ: interferon gamma, inj.: injectie, i.p.: intra peritoneaal, IP: infectieuze partikels, i.t.: intratumoraal, i.v.: intraveneus, kg: kilogram, ku: keeluitstrijkje, MDR: multiple drug resistance, ml: milliliter, mnd: maand(en), neg: negatief, neo: neomycine phosphotransferase, ng: nanogram, non-q: kwalitatief, nu: neusuitstrijkje, PBL: perifere bloed lymfocyten, PBMC: perifere bloed mononucleaire cellen, pfu: plaque forming units, pos: positief, pt: patiënt(en), PU: particle unit, q: kwantitatief, RCR: replicatie competent retrovirus, RU: replicating unit, s.c.: subcutaan, sem: semen, ser: serum, sk: skin (huid), TK: thymidine kinase, TU: transducing units, u: urine, vg: vector genoom, VPC: vector producerende cellen, wk: weken, y: jaren, zkh: ziekenhuis.*

## 9.5 Karakteristieken van in literatuur gevonden shedding assays

	PCR	viruskweek	ELISA
<b>retrovirale vector</b>	<u>detectiegrens:</u> - 1 pos cel in $10^5$ cellen [PBMC] (Amado, Mitsuyasu et al. 2004) - $\geq 10$ proviraal RCR in $0,5 \times 10^6$ cellen met 99,9% zekerheid [bloed, PBMC] (Dunbar, Kohn et al. 1998; Rainov 2000) - 1-3 pos cellen/500 ng DNA [PBMC] (Klatzmann, Cherin et al. 1998; Klatzmann, Valery et al. 1998) - 7 kopieën/ $10^6$ cellen [PBMC] (Mitsuyasu, Anton et al. 2000) - 1 kopie/ $1,5 \times 10^5$ diploïd cel genoom [PBMC] (Powell, Ragni et al. 2003) - 1 kopie in $10^5$ genomisch DNA [lymfocyten, sp] (Roth, Nguyen et al. 1996) - 5 provirussen in $1,2 \mu\text{g}$ chromosomaal DNA [plasma] (Sandmair, Loimas et al. 2000)	Marker rescue assay: <u>detectiegrens:</u> - 50 pos cellen/ $1 \times 10^6$ PBL [PBL] (Rainov 2000)	
<b>adenovirale vector</b>	<u>detectiegrens:</u> - $10^3$ pfu/ $0,5 \text{ ml}$ [u, bloed, ku, sp] (Clayman, el-Naggar et al. 1998) - 2,5 kopieën DNA [PBL, plasma, f, ku, BAL, u] (Griscelli, Opolon et al. 2003) - 10-100 VP/ml [u] (Herman, Adler et al. 1999) - 16 kopieën vector DNA [plasma, ser] (Immonen, Vapalahti et al. 2004) - 100 VP/ $\mu\text{l}$ [bloed] (Lu, Zheng et al. 2004) - $10^3$ pfu/ml [plasma] (Nemunaitis, Swisher et al. 2000) - 5 provirussen in $1,2 \mu\text{g}$ chromosomaal DNA [plasma, u] (Sandmair, Loimas et al. 2000) - $1,5 \times 10^3$ - $1,5 \times 10^4$ pfu [bloed, f, ku, u] (Stewart, Lassam et al. 1999; Trudel, Trachtenberg et al. 2003) - 5000 kopieën/ml [plasma] (Tong, Nemunaitis et al. 2005) - 10 VP/ml [u] (Trask, Trask et al. 2000) - 2 VP/ml [bloed, u] (Freytag, Khil et al. 2002; Freytag, Stricker et al. 2003) - 500 VP/ml [bloed, plasma] (Hamid, Varterasian et al. 2003; Galanis, Okuno et al. 2005) - $1,05 \times 10^4$ VP/ml [plasma] (Nemunaitis, Cunningham et al. 2001; Nemunaitis, Khuri et al. 2001; Nemunaitis, Cunningham et al. 2003) - $1,05 \times 10^4$ VP/ml [bloed] (Reid, Galanis et al. 2001; Reid, Galanis et al. 2002) <u>kwantificeringsgrens:</u> - 1300 kopieën/ml [plasma] (DeWeese, van der Poel et al. 2001) - 2000 VP/ml [bloed] (Galanis, Okuno et al. 2005) - 1000 VP/ml [plasma] (Hamid, Varterasian et al. 2003) - $4,2 \times 10^4$ VP/ml [plasma] (Nemunaitis, Cunningham et al. 2001; Nemunaitis, Khuri et al. 2001; Nemunaitis, Cunningham et al. 2003)	<u>detectiegrens:</u> - 10 pfu/ $0,5 \text{ ml}$ [u, bloed, ku, sp] (Clayman, el-Naggar et al. 1998) - 250 IU/ml [bloed, u] (Grines, Watkins et al. 2002) - 10 IU/monster [sp, f, u, nu] (Joseph, O'Sullivan et al. 2001) - 10 pfu/ml [plasma, u, sp] (Nemunaitis, Swisher et al. 2000) - 10 pfu [bloed, f, u, ku] (Stewart, Lassam et al. 1999; Trudel, Trachtenberg et al. 2003) - 20 pfu [ser, nu, u] (Trask, Trask et al. 2000) - $10^3$ IU/ml [nu, sp, f, u] (Zabner, Ramsey et al. 1996) - 1 IU [u, sp, f, ku] (Zuckerman, Robinson et al. 1999) - 50 pfu/ml [u] (DeWeese, van der Poel et al. 2001) - 100 IP/ml [u, bloed] (Freytag, Khil et al. 2002; Freytag, Stricker et al. 2003) <u>kwantificeringsgrens:</u> - 1000 IU/ml [bloed, u] (Grines, Watkins et al. 2002)	<u>detectiegrens:</u> - ratio van mean optical densities van monster tov onbehandeld monster $> 0,28$ [u, f] (Dummer, Bergh et al. 2000) - $2 \times 10^5$ VP/ml [plasma, ku, u, f] (Palmer, Mautner et al. 2004)
<b>AAV</b>	<u>detectiegrens:</u> - 1 vector sequentie/ $10^4$ cellen [PBMC, bloed] (Aitken, Moss et al. 2001; Flotte, Zeitlin et al. 2003) - 50 kopieën in $1 \mu\text{g}$ DNA [ser, sp, u, f] (Kay, Manno et al. 2000) - 1 vector sequentie/ 1000 cellen [bloed] (Wagner, Messner et al. 1999)	<u>detectiegrens:</u> - 1000 IU/ $10 \mu\text{l}$ [f] (Aitken, Moss et al. 2001; Flotte, Zeitlin et al. 2003) - 100 IU/ $10 \mu\text{l}$ [sp, u, BAL, nu] (Aitken, Moss et al. 2001; Flotte, Zeitlin et al. 2003; Moss, Rodman et al. 2004) - 1000 RU/ml [nu] (Wagner, Messner et al. 1999)	
<b>ALVAC</b>		<u>detectiegrens:</u> - 50 pfu/ml [natte monsters] (Borysiewicz, Fiander et al. 1996) - 500 pfu/ml [droge monsters] (Borysiewicz, Fiander et al. 1996) - 2-9 pfu/ml [natte monsters] (Scholl, Balloul et al. 2000) - 150 pfu/ml [droge monsters] (Scholl, Balloul et al. 2000)	

## 9.6 Overzicht gentherapie studies in Nederland

BGGO nummer	Principal Investigator	Gentherapeuticum	Vergunning-status	Klinische status	Opmerkingen
91-008	Prof.dr. D Valerio, Crucell NV	Retrovirus	Teruggetrokken	Afgerond	
93-008	Prof.dr. D Valerio, Crucell NV	Retrovirus	Teruggetrokken	Afgerond	
95-004	Dr. GAP Hospers, UMCG	Retrovirus	Van kracht	Afgerond	Fase III studie / Zelfde protocol als 95-015
95-010*	Dr. GAP Hospers, UMCG	ALVAC	Van kracht	Afgerond	Zelfde protocol als 97-005
95-014	Prof.dr. D Valerio, Crucell NV	Adenovirus	Teruggetrokken	Afgerond	
95-015	Prof.dr. FJ Cleton, LUMC	Retrovirus	Teruggetrokken	Afgerond	Fase I-II / Zelfde protocol als 95-004
96-007	Dr. GAP Hospers, UMCG	Adenovirus	Van kracht	Afgerond	
96-027	Hr. Kievid, Aventis Pharma/Rhone-Poulenc Rorer	Adenovirus	Teruggetrokken	Ingetrokken	Niet gelopen in NL
97-001	<i>Dr. LG Visser, LUMC</i>	<i>Cholera</i>	<i>Teruggetrokken</i>	-	<i>Geen virale vector</i>
97-005	Mw. R Elhabib, Pasteur Merieux Connaught	ALVAC	Teruggetrokken	Afgerond	Zelfde protocol als 95-010
97-014	Dr. CHJ Lamers, Erasmus MC	Retrovirus	Van kracht	On hold	Sinds 2003 on hold ivm levertoxiciteit
97-019*	Dr. H Lockhorst, UMC Utrecht	Retrovirus	Teruggetrokken	Ingetrokken	Vectorbatch was positief voor RCR
97-020	Prof.dr. A Hagenbeek, UMC Utrecht	Retrovirus	Van kracht	Goedgekeurd	Inclusie patiënten vanaf september 2005
98-007	Prof.dr. PAE Sillevius Smitt, Erasmus MC	Adenovirus	Teruggetrokken	Afgerond	
99-010	<i>Dr. RA Tio, UMCG</i>	<i>Naakt DNA</i>	<i>Van kracht</i>	<i>Afgerond</i>	<i>Geen virale vector</i>
99-012	<i>Dr. GAP Hospers, UMCG</i>	<i>Naakt DNA</i>	<i>Van kracht</i>	<i>Afgerond</i>	<i>Geen virale vector</i>
99-015	Prof.dr. CH Bangma, Erasmus MC	Adenovirus	Van kracht	Afgerond	
99-016*	Dr. TWJ Huizinga, LUMC	Retrovirus	Teruggetrokken	Ingetrokken	Crucell financiering project gestaakt na Gelsing incident
99-018	Dr. B Mouterde, Pasteur Merieux Connaught	ALVAC	Teruggetrokken	Afgerond	Opgevolgd door 01-005
00-003	Dr. GAP Hospers, UMCG	Semlike forest virus	Van kracht	Ingetrokken	Problemen met productie van de vector
01-001	Dr. WR Gerritsen, VUmc	Adenovirus	Van kracht	Afgerond	
01-003	Prof.dr. AB Löwenberg, Erasmus MC	Retrovirus	Van kracht	Ingetrokken	Zelfde protocol als 97-020, niet van start gegaan in Rotterdam

BGGO nummer	Principal Investigator	Gentherapeuticum	Vergunning-status	Klinische status	Opmerkingen
01-004	Dr. A Westermann, AMC	Adenovirus	Teruggetrokken	Afgerond	
01-005	Dr. S Osanto, LUMC	ALVAC	Teruggetrokken	Afgerond	Zelfde protocol als 99-018
01-007	Dr. S Osanto, LUMC	Adeno-associated virus	Van kracht	Ingetrokken	Niet gelukt om uit tumormateriaal autoloog vaccin te maken
01-008	Dr. WHJ Kruit, Erasmus MC	Adeno-associated virus	Van kracht	Ingetrokken	Problemen met verkrijgen van voldoende autologe tumorcellen voor vaccinatie
01-009	<i>Prof.dr. JH van Bockel, LUMC</i>	<i>Naakt DNA</i>	<i>Van kracht</i>	-	<i>Geen virale vector</i>
01-010	<i>Dr. J Theys, Academisch ziekenhuis Maastricht</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Van kracht</i>	-	<i>Geen virale vector</i>
02-001	<i>Dr. Braat, AMC</i>	<i>Lactococcus Lactis</i>	<i>Van kracht</i>	-	<i>Geen virale vector</i>
02-002	Dr. PC Smits, Erasmus MC	Adenovirus	Van kracht	Ingetrokken	
03-001	Dr. RGHH Nelissen, LUMC	Adenovirus	Van kracht	Lopend	
03-002	<i>Prof.dr. van Belkum, Erasmus MC</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>Van kracht</i>	-	<i>Geen virale vector</i>
03-005	Prof.dr. RA Coutinho, GG&GD Amsterdam	MVA	Teruggetrokken	Ingetrokken	Gentherapeuticum bleek niet immunogeen, door sponsor studie stopgezet
03-008	Dr. WR Gerritsen, VUmc Cancer Center Amsterdam	Adeno-associated virus	Van kracht	Lopend	
05-001	Dr. E. Stroes, AMC	Adeno-associated virus	Van kracht	Lopend	

*Niet virale gentherapie studies zijn gearceerd weergegeven.*

*(-) geen opmerking bij deze studie*

*\* Voor publicatie van deze studie is toestemming verkregen van de principal investigator*

*Afkortingen: MVA: modified Vaccinia Ankara Virus, PI: principal investigator*

## 9.7 *Sjabloon Nederlandse gentherapie studies*

### **Nummer studie bureau GGO /**

**Titel**

**Klinische status**      Aangevraagd / Goedgekeurd / On-hold / Lopend / Afgerond/  
Ingetrokken

**Interview over studie gehouden met**  
**Datum interview**

---

**Principal investigator**  
**Overige contactpersonen**  
**Instituut**

---

### **Studie opzet**

**Type trial** (Fase 1 etc.)

**Doel**

**Abstract**

**Ziekte**

**Aantal patiënten** (evt. selectiecriteria, totaal gepland, tot nu toe opgenomen in studie)

**Type vector**

**Therapeutisch gen / selectiemarker**

**Wijze van toediening**

**Dosis** (in virus partikels, indien in pfu of iu vragen naar ratio / meerdere dosissen)

---

### **Shedding info**

**Gebruikte shedding assays** (commercieel / self-made)

**Karakteristieken shedding assays** (detectielimiet, sensitiviteit, specificiteit)

**Type samples** (excreta/organen/serum)

**Aantallen en tijdstippen samples**

---

### **Resultaten**

**Algemene resultaten studie**

**Shedding resultaten**

**Resultaten gepubliceerd** (nb op welke wijze dan ook)

---

### **Conclusies**

**Algemeen**

**Shedding**

---

**Overige bijzonderheden**

Bronvermelding