

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 5 september 2019
KENMERK CGM/190905-01
ONDERWERP Advies generieke milieurisicobeoordeling klinische studies met AAV-vectoren

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

De COGEM heeft, gezien het feit dat zij in het verleden veelvuldig geadviseerd heeft over genterapiestudies met AAV-vectoren, een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met deze vectoren opgesteld ten einde de vergunningverleningsprocedure voor deze studies te stroomlijnen.

Samenvatting:

Wereldwijd zijn er honderden klinische studies uitgevoerd waarbij gebruik gemaakt wordt van virale vectoren die afgeleid zijn van Adeno-associated virussen (AAV). De COGEM heeft de afgelopen jaren een groot aantal adviezen over dergelijke studies uitgebracht, en bij alle studies bleken de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein. Mede naar aanleiding hiervan heeft de COGEM een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met AAV-vectoren opgesteld. Deze generieke milieurisicobeoordeling kan het vergunningverleningsproces vereenvoudigen en stroomlijnen.

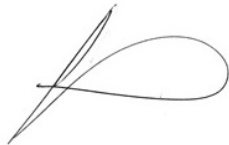
AAV's zijn apathogene virussen die alleen kunnen repliceren in aanwezigheid van een helpervirus. Bij AAV-vectoren zijn alle virale genen verwijderd. Alleen de virale sequenties aan de uiteinden van het genoom (ITR's) zijn behouden gebleven, waardoor de vectoren ook in aanwezigheid van een helpervirus niet meer in staat zijn tot replicatie. De COGEM concludeert dat, gezien de eigenschappen van de gebruikte AAV-vectoren, de risico's voor mens en milieu bij klinische studies met deze vectoren verwaarloosbaar klein zijn.

Zij signaleert dat bij klinische studies met AAV-vectoren geen verspreiding van het ggo in het milieu zal plaatsvinden, en dat er daarom vanuit milieurisico-overwegingen geen beletsels zijn om vergunningaanvragen voor deze klinische studies onder zogenaamd Ingeperkt Gebruik te laten plaatsvinden.



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

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Dr. J. Westra, Bureau ggo
Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

Generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met AAV-vectoren

COGEM advies CGM/190905-01

1. Inleiding

Bij klinische genterapiestudies wordt veel gebruik gemaakt van virale vectoren die afgeleid zijn van Adeno-associated virus (AAV). Deze vectoren hebben ten opzichte van andere virale vectoren onder meer als voordeel dat AAV niet pathogeen is, geen virale genen in de vector aanwezig zijn, de vector niet repliceert in de cel, en een per vector verschillend weefseltropisme mogelijk is.¹ De eerste genetisch gemodificeerde AAV-vector die bij een genterapiestudie werd toegepast, dateert van midden jaren 90.² Sindsdien zijn wereldwijd meer dan 200 klinische studies met van AAV afgeleide vectoren uitgevoerd.³ Ook zijn in de EU twee op AAV gebaseerde genterapeutica op de markt toegelaten.^{4,5}

Generieke milieurisicobeoordeling

De COGEM heeft de afgelopen jaren een groot aantal adviezen uitgebracht over klinische studies met AAV-vectoren. De voorgelegde dossiers en gebruikte vectoren vertonen veel overlap, en bij alle studies bleken de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein. Mede naar aanleiding hiervan, heeft de COGEM in het voorliggende advies een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met AAV-vectoren opgesteld. De voor de milieurisicobeoordeling relevante aspecten en informatie worden hieronder verder besproken.

2. Adeno-associated virus (AAV)

2.1 Taxonomie van AAV

Adeno-associated virussen (AAV's) behoren tot de familie van de *Parvoviridae*, subfamilie *Parvovirinae* en het genus *Dependoparvovirus*. Tot op heden zijn er meer dan 100 verschillende AAV's uit verscheidene gastheren geïsoleerd. Volgens de huidige taxonomische indeling zijn er binnen het genus *Dependoparvovirus* meer dan 20 AAV's ondergebracht.⁶ Deze worden verdeeld over zes species: *Adeno-associated dependoparvovirus A* (omvat onder meer Adeno-associated virus 1, 2, 3, 8 en 9), *Adeno-associated dependoparvovirus B* (omvat onder meer Adeno-associated virus 5), *Avian dependoparvovirus 1* (omvat het Avian adeno-associated virus), *Chiropteran dependoparvovirus 1* (omvat het Bat adeno-associated virus), *Pinniped dependoparvovirus 1* (omvat het California sealion adeno-associated virus), en *Squamate dependoparvovirus 1* (omvat het Serpentine adeno-associated virus).⁶ De overige AAV's zijn nog niet taxonomisch ingedeeld.

Er bestaan verschillende AAV serotypes die aan de hand van een letter/cijfer-code worden weergegeven (zoals AAV1, AAV2, AAV5, AAV8, AAV9, AAVrh10). Het serotype wordt bepaald door hypervariabele regio's in de eiwitstructuren aan de buitenkant van het virusdeeltje. Deze structuren hebben antigene eigenschappen, en zijn van belang voor de gastheerspecificiteit en het weefseltropisme.^{7,8,9}

2.2 Eigenschappen van AAV

AAV's kunnen bijna alle gewervelde dieren, inclusief de mens, infecteren.¹⁰ Infecties met AAV's komen wereldwijd en frequent voor, maar gaan voor zover bekend niet gepaard met ziekteverschijnselen.^{11,12,13} Ongeveer 95% van de humane populatie is ooit blootgesteld aan AAV2 en 80% is hiervoor seropositief.¹⁴ Overdracht van AAV vindt waarschijnlijk plaats via de respiratoire of gastro-intestinale route.⁸

AAV's zijn kleine, enkelstrengs DNA-virussen met een genoom van circa 5 kilobasen (kb). Het genoom wordt omhuld door een eiwitmantel (capside).⁸ In het genoom bevinden zich twee genen: *rep* en *cap/AAP*. Het DNA bevat drie promotoren voor de transcriptie van het mRNA, waarbij door 'splicing' van een deel van het mRNA verschillende eiwitten verkregen kunnen worden.⁸ Het *rep* (replicatie) gen codeert voor vier replicase-eiwitten (Rep78, Rep68, Rep52 en Rep40) die een rol spelen bij de virusreplicatie, de expressie van de structurele eiwitten, en de integratie van het virusgenoom in het genoom van de gastheer. Het *cap* (capside) gen codeert voor drie manteleiwitten (VP1, VP2 en VP3), die de virusmantel vormen.⁸ Binnen het *cap* gen bevindt zich 'nested' een alternatief 'open reading frame' (ORF) dat codeert voor het 'assembly activating protein' (AAP).^{14,15} Van AAP wordt verondersteld dat het een rol speelt bij de assemblage van het capsid.

De *rep* en *cap/AAP* genen worden geflankeerd door twee 'inverted terminal repeats' (ITR's). Deze fungeren als start van de DNA-replicatie en als het 'packaging' signaal (inpakken van het virale genoom in de capsid-eiwitten). Daarnaast zijn de ITR's betrokken bij de integratie van het virale DNA in het chromosoom van de gastheer.¹⁰

AAV's onderscheiden zich van de andere virussen binnen het genus *Dependoparvovirus* doordat zij niet-autonoom repliceren (replicatiedeficiënt). Voor replicatie hebben zij een helpvirus nodig, zoals adenovirussen of herpesvirussen.^{10,16,17} Bij afwezigheid van een helpvirus zal het virale genoom niet repliceren, en ontstaat er een persistente 'infectie' waarbij het AAV genoom latent intra- of extrachromosomaal (episomaal) in de celkern aanwezig blijft.^{10,14} Bij bijvoorbeeld AAV2 (gastheer mens en mensapen), integreert ongeveer 0,1% van de virusdeeltjes in het gastheergenoom.^{18,19} De integratie van het AAV2 genoom vindt specifiek plaats in de AAVS1 site van de lange (q) arm van chromosoom 19.²⁰

Of een *Dependoparvovirus* niet-autonoom repliceren is, kan uit zijn naam worden afgeleid omdat hierin de term adeno-associated virus (AAV) is verwerkt. Het *Anseriform dependoparvovirus 1* en het *Squamate dependoparvovirus 2* zijn de enige virussoorten binnen het genus *Dependoparvovirus* die wél zelfstandig kunnen repliceren en géén helpvirus nodig hebben.^{10,16} In de virussen die onder deze soorten vallen, is niet de term adeno-associated virus, maar 'parvovirus' verwerkt. *Anseriform dependoparvovirus 1* omvat de vogelvirussen Duck parvovirus, Goose parvovirus en Goose parvovirus-PT. *Squamate dependoparvovirus 2* omvat het hagedisvirus Bearded dragon parvovirus.⁶

3. AAV-vectoren

3.1 Kenmerken van AAV-vectoren

Bij AAV-vectoren zijn de *rep* en *cap/AAP* genen van AAV verwijderd en vervangen door een transgene expressiecassette. Deze is samengesteld uit het gen van interesse en regulatoire sequenties, zoals promotoren en terminatoren. De expressiecassette is tussen de ITR's geplaatst. Tijdens de productie van de vector worden de *rep* en *cap/AAP* genen van AAV *in trans* aangeboden, en wordt het vectorgenoom ingepakt in de *in trans* tot expressie gebrachte capsid-eiwitten.

Doorgaans zijn de bij gentherapie toegepaste AAV-vectoren afgeleid van AAV2, dat wil zeggen dat ze beschikken over de ITR's van AAV2.²¹ De capsid-eiwitten kunnen van een ander AAV-serotype afkomstig zijn. Dit wordt aangegeven als AAV2/n, waarbij n het AAV serotype van de herkomst van het capsid vertegenwoordigt.²² Om het celtropisme en de intracellulaire expressie van het transgen te beïnvloeden, of neutralisatie door antilichamen tegen te gaan, kunnen in de capsid-eiwitten modificaties worden aangebracht, of componenten van capsid-eiwitten van verschillende serotypes worden uitgewisseld.^{22,23,24}

Bij sommige AAV-vectoren ('self-complementary' (sc-) AAV-vectoren) zijn er mutaties in de sequentie van de ITR aan de 'linkerzijde' aangebracht. Hierdoor wordt er in de productiecellijn door middel van 'hairpin' vorming en 'self-annealing' een dubbelstrengs (ds) DNA-molecuul gevormd, en in deze vorm in het vectordeeltje ingepakt. In de lichaamscellen van de patiënt resulteert deze ds-DNA-vorm in een snellere transcriptie van het transgen.²⁵

AAV-vectoren kennen een beperkte kloneringscapaciteit: in een AAV capsid kan maximaal een vectorgenoom van 5,2 kilobasen worden ingepakt.²⁶ Voor het uitbreiden van de kloneringscapaciteit zijn de zogenaamde 'dual' vectorsystemen ontwikkeld.^{27,28}

3.2 Productiesystemen voor klinische toepassingen

Voor AAV-vectorproductie is de hulp van een helpervirus nodig, maar bij de meeste productiesystemen is geen volvirulent helpervirus aanwezig. De tot nu toe meest toegepaste systemen bestaan uit specifieke cellijnen die getransfecteerd worden met het plasmide dat het beoogde vectorgenoom bevat (het 'vectorplasmide'), en waarin één, maar meestal meerdere, helperplasmiden aanwezig zijn. Deze bevatten de *rep* en *cap/AAP* genen van AAV en de benodigde zogenaamde 'helpergenen' van het adenovirus.^{22,29} Ook zijn er productiesystemen die gebruik maken van replicatiedeficiënt adenovirus in combinatie met HEK293 of HeLa cellijnen. Bij deze systemen is in één van de chromosomen van de cellen een deel van de adenovirale genen geïntegreerd. Daarnaast zijn er nog andere systemen, zoals systemen die gebruik maken van recombinante herpesvirussen of baculovirussen.³⁰ Baculovirussen hebben insecten als gastheer en kunnen geen zoogdiercellen infecteren.

3.3 Vectorbatches

Gedurende het productieproces van een AAV-vector kunnen er heterologe sequenties (bijvoorbeeld afkomstig van cellulair of plasmide DNA) in het capsid worden ingepakt. Het is een bekend fenomeen dat 1:100 tot 1:1000 vectordeeltjes in AAV-vectorbatches heterologe (niet-beoogde en niet

aan de vector gerelateerde) sequenties bevatten.^{31,32,33,34} Ook kan er tijdens de productie ten gevolge van recombinatie tussen het vectorplasmide en helperplasmides, 'replicatiecompetent' AAV (rcAAV)^a of pseudo-wild-type AAV (virusdeeltjes met fragmenten van het AAV-genoom) gevormd worden.^{35,36} Ten einde dit te ondervangen, zijn er productiesystemen ontwikkeld om dit tegen te gaan.^{31,33,36,37,38} Daarnaast zijn in vectorbatches 'lege' virusdeeltjes aanwezig.^{22,32,33,34}

Na productie worden de vectorbatches gezuiverd om niet ingepakte nucleïnezuren (vectorgenoom, plasmide DNA, cellulair DNA, RNA) en lege eiwitmantels te verwijderen.^{29,30,39} Indien er tijdens de productie gebruik is gemaakt van een volvirulent helpervirus, wordt dit geïnactiveerd of verwijderd, en wordt de batch gecontroleerd op afwezigheid hiervan.^{29,33,40,41,42}

4. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft in 2018 geadviseerd om AAVrh10, AAVpo1, en alle AAV's vallend onder de soorten *Adeno-associated dependoparvovirus A* en *Adeno-associated dependoparvovirus B*, als niet-ziekteverwekkend in te delen in de laagste pathogeniteitsklasse (pathogeniteitsklasse 1).⁴³ AAVrh10 en AAVpo1 zijn apart benoemd omdat deze virussen nog niet door de ICTV taxonomisch zijn ingedeeld.⁶

Sinds 2005 heeft de COGEM negen keer adviezen uitgebracht over de mogelijke risico's voor mens en milieu van klinische studies met AAV-vectoren. Het betrof studies ter behandeling van stofwisselingsziekten,^{44,45,46} hartfalen,⁴⁷ hemofilie,^{48,49,50} reuma,⁵¹ en spinale musculaire atrofie.⁵² De vectoren waren met behulp van verschillende productiesystemen vervaardigd: een HEK293 cellijn in combinatie met een vectorplasmide en één of twee helperplasmides,^{44,45,46,51,52} een HeLa S3 cellijn in combinatie met een vector/packagingplasmide en wild-type adenovirus (HAdV5),^{47,50} of insectencellijn Sf9 in combinatie met drie verschillende recombinante baculovirussen.^{48,49} De vectoren waren allen voorzien van de ITR's van AAV2, maar werden door verschillende capsides omhuld (afkomstig van AAV1, AAV5, AAV8, AAV9, AAVhu37). De toegediende doses varieerden van 1×10^{11} tot $1,1 \times 10^{14}$ vectorgenoomkopieën per kg lichaamsgewicht (vg/kg).^{44,52} De vector werd parenteraal toegediend in spierweefsel, gewrichten of bloedbaan.

De COGEM achtte bij alle studies de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein. Zij adviseerde tijdens de studies enkele aanvullende voorschriften te hanteren, of stemde in met de voorgestelde voorschriften van de aanvrager. In haar laatste adviezen merkte de COGEM op dat de kans op kiembaantransmissie van AAV-vectoren verwaarloosbaar klein is, en dat zij daarom het in acht nemen van effectieve anticonceptie niet noodzakelijk acht.^{45,50} Tevens was zij van oordeel dat het voorschrift over het niet toepassen van de AAV-vector als er klinische aanwijzingen zijn voor een actieve virale infectie, uit *milieurisico*-overwegingen niet noodzakelijk is.^{45,49,50}

^a De term 'replicatiecompetent' AAV wordt gebruikt om aan te geven dat het gelijk is aan wild-type AAV. In feite kan AAV op zichzelf echter niet repliceren.

5. Overwegingen bij de milieuristicobeoordeling

Bij de milieuristicobeoordeling van klinische studies staat de vraag centraal of niet aan de studie deelnemende mensen of dieren ('derden') met de AAV-vector of daarvan afgeleide sequenties geïnfecteerd kunnen worden en daar nadelige gevolgen van kunnen ondervinden. De eventuele milieuristicos zijn gerelateerd aan de pathogeniteit van de vector, de verspreiding van de vector in het milieu, en de mogelijke vorming van nieuwe recombinante virussen. Ten behoeve van de onderbouwing van het advies worden de genoemde aspecten hieronder verder uitgewerkt.

5.1 Pathogeniteit van een AAV-vector

Pathogeniteit wild-type AAV

De COGEM heeft de soorten *Adeno-associated dependoparvovirus A* en *Adeno-associated dependoparvovirus B* als niet-ziekteverwekkend in pathogeniteitsklasse 1 ingedeeld.⁴³

Mogelijke schadelijke effecten

Recent is een ernstig effect gemeld bij een klinische studie met een AAV-vector. Het betrof het overlijden van een patiënt met spinale musculaire atrofie (baby) tijdens een lopende fase 3 studie.^{53,54,55,56} Hoewel de fabrikant in eerste instantie meldde dat de toediening van de AAV-vector hier mogelijk aan bijgedragen heeft, bleek later uit onderzoek dat het overlijden niet veroorzaakt was door de behandeling.⁵⁷ Het gentherapeuticum is inmiddels door de U.S. Food and Drug Administration (FDA) goedgekeurd voor toelating in de Verenigde Staten.⁵⁸

De COGEM merkt op dat bij studies waar AAV-vectoren gebruikt worden, de te behandelen ziektebeelden complex kunnen zijn. Sommige ziektebeelden kennen een hoge mortaliteit. Zij kan daarom niet uitsluiten dat het toepassen van een AAV-vector bij patiënten, die al in een slechte conditie verkeren, tot (ernstige) neveneffecten kan leiden.

In 2018 is voor een vector met dezelfde transgene expressiecassette als die van de hierboven genoemde fase 3 studie, maar met een iets ander capsid-eiwit, gerapporteerd dat deze bij non-humane primaten en biggen ernstige toxische verschijnselen heeft veroorzaakt.⁵⁹ Het betrof een studie met een klein aantal dieren (drie apen, drie biggen). Op dit moment is het oorzakelijk verband van de schadelijke effecten (nog) niet inzichtelijk in de literatuur. De COGEM merkt op dat er misschien verontreinigingen in de vectorbatch aanwezig waren. Ook is het mogelijk dat het tot expressie gebrachte eiwit toxisch was, omdat het een humaan specifiek eiwit betrof en geen lichaamseigen eiwit.^{59,60}

In een aantal klinische studies met AAV-vectoren zijn in de bloedbaan van patiënten verhoogde leverenzymwaarden geconstateerd, zonder dat dit tot ernstige nadelige gevolgen voor de betrokken patiënten leidde.^{61,62,63,64,65} In het geval van zeer hoge waarden zijn de patiënten met corticosteroiden (prednison) behandeld.

Integratie van vectorgenoom in het genoom van proefpersoon of proefdier

Gerichte integratie van AAV in het genoom van de gastheer is afhankelijk van de aanwezigheid van de Rep eiwitten, met name Rep78/68.⁶⁶ Omdat de virale genen ontbreken, is de kans op integratie van een AAV-vector in de specifieke integratiesite van het genoom van de gastheer verwaarloosbaar klein. Incidentele integratie van recombinant AAV op willekeurige plekken in het genoom kan plaatsvinden, met name bij cellijnen.⁶⁷ In de literatuur is gerapporteerd dat bij muizen AAV-vectoren op verschillende locaties in het genoom zijn geïntegreerd.^{14,22} Bij twee studies werd vermeld dat pasgeboren muizen hierdoor hepatocellulair carcinoom ontwikkelden.^{68,69} Uit de resultaten bleek een correlatie met de toegediende vector dosis en de integratiesite in het muizengenoom (*Rian* locus), en dat er mogelijk een relatie was met de aard van gebruikte promotor in de transgene expressiecassette.^{22,69}

De COGEM merkt op dat AAV-vectoren niet efficiënt in het genoom integreren, maar voornamelijk episomaal in de celkern aanwezig zijn, onder meer in de vorm van concatameren.^{10,70,71,72} Hierdoor persisteren zij niet in actief delende cellen, wat de kans op integratie vermindert.

Inmiddels zijn er wereldwijd meer dan 200 klinische trials met van AAV afgeleide vectoren uitgevoerd.³ Ook is er veel onderzoek gedaan naar de toepassing van AAV-vectoren bij grotere zoogdieren (non-humane primaten, honden).²² Van al deze studies is er slechts bij één studie melding gemaakt van de integratie van vectorgenoom in het DNA van een patiënt. Het betrof de behandeling van patiënten met lipoproteïne lipase-deficiëntie. Het vectorgenoom was willekeurig geïntegreerd in kern en mitochondriaal DNA.⁷³ Voor zover bij de COGEM bekend, is er tot nu toe geen melding gemaakt dat de toediening van AAV-vectoren bij grotere zoogdieren of de mens aanleiding gaf tot tumorvorming.

5.2 Replicatie, uitscheiding en verspreiding

Replicatie

Wild-type AAV's zijn voor hun replicatie afhankelijk van een helpervirus.^{8,10} Een AAV-vector kan echter, door het ontbreken van de Rep- en Cap-eiwitten, zelfs in aanwezigheid van een helpervirus niet meer repliceren. AAV-vectoren zijn daardoor biologisch ingeperkt.

Uitscheiding en verspreiding

Na toediening van een vector zal deze zich in het lichaam over verschillende weefsels en organen verspreiden, en na verloop van tijd uitgescheiden worden. AAV-vectoren kunnen via bloed, feces, semen en urine worden uitgescheiden.^{74,75} De hoeveelheid uitgescheiden vector is dosis-afhankelijk en neemt in de tijd geleidelijk af, mede doordat de patiënt neutraliserende antilichamen tegen het capsid ontwikkelt.^{61,62,76,77} Bij een klinische studie met een op AAV2/5 gebaseerde vector (6×10^{13} vg/kg lichaamsgewicht) werd de vector tot week 52 nog via sperma, speeksel en feces uitgescheiden. De COGEM plaatst hierbij de kanttekening dat, wanneer er vector DNA in lichaamsvloeistoffen of

weefsels wordt aangetoond, bijvoorbeeld door middel van PCR, dit niet betekent dat het een daadwerkelijk infectieuze vector betreft.

AAV-vectoren die in het milieu worden uitgescheiden, zijn biologisch ingeperkt en zullen zich niet verder verspreiden. De COGEM acht de milieurisico's ten gevolge van uitscheiding van AAV-vectoren daarom verwaarloosbaar klein.

Met betrekking tot de uitscheiding van AAV-vectoren via sperma merkt de COGEM op dat bij de twee patiënten, waarbij een AAV-vector nog in week 52 in het sperma werd aangetroffen (zie hierboven),⁶⁴ de vector zich niet in de spermacellen bleek te bevinden. Bij een klinische studie met een AAV2 vector bleek uit nader onderzoek naar de motiele fractie van het sperma dat daarin geen vectorgenoom aanwezig was.⁷⁸ Deze bevinding werd ondersteund door een *in vivo* studie bij konijnen, waarbij vectorgenoom voornamelijk werd aangetoond in het vocht en niet in de cellulaire fractie.⁷⁹ Tevens werd bij deze studie aangetoond dat er na vier dagen geen infectieuze vectordeeltjes meer in het sperma detecteerbaar waren, en dat er na verloop van tijd in nieuw gevormde spermacellen geen vectorgenoom werd gedetecteerd. Studies waarbij AAV-vectoren met verschillende capsides werden toegediend, lieten zien dat kiembaantransmissie niet optreedt.^{80,81} De COGEM wijst er op dat wild-type AAV latent persisteert in bepaalde lymfocyten en daardoor in de cellulaire fractie van sperma aanwezig kan zijn.^{82,83}

Op basis van bovenstaande gegevens concludeert de COGEM dat (het genoom van) AAV-vectoren enkele weken tot maanden in sperma aangetoond kan worden. Dit is een tijdelijk fenomeen. Het vectorgenoom is aanwezig in het vocht en niet in de spermacellen. De COGEM acht daarom de kans dat er ten gevolge van behandeling met een AAV-vector kiembaantransmissie optreedt, verwaarloosbaar klein.

5.3 Recombinatie en complementatie

Tijdens het productieproces van een virale vector of na toediening aan de patiënt zou de vector door complementatie of recombinatie gemobiliseerd kunnen worden, of zouden 'repliatiecompetente' virussen gevormd kunnen worden.

In AAV-vectorbatches kunnen er lage hoeveelheden plasmide DNA of gastheercel DNA- sequenties in het eindproduct aanwezig zijn (zie paragraaf 3.3). De COGEM is van oordeel dat deze heterologe sequenties niet leiden tot risico's voor mens en milieu, omdat zij geen selectief voordeel opleveren en zich niet kunnen repliceren of verder kunnen verspreiden.

Indien tijdens de productie recombinatie tussen sequenties van de *rep* en *cap/AAP* bevattende helperplasmiden en vectorsequenties van de vectorplasmide zou leiden tot rcAAV, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn, omdat er door de recombinatie geen transgen meer in het rcAAV aanwezig is. Het rcAAV virus zou in dat geval gelijk zijn aan apathogeen wild-type AAV.

Na toediening van de AAV-vector aan de patiënt, kan er theoretisch in aanwezigheid van wild-type AAV en helpervirus homologe recombinitie of complementatie optreden. Echter, de kans dat er in eenzelfde cel zowel vector, wild-type AAV en een helpervirus aanwezig zijn, is zeer tot verwaarloosbaar klein.

Door complementatie in de proefpersoon of patiënt zouden opnieuw vectordeeltjes kunnen worden gevormd, doordat het vectorgenoom gerepliceerd en ingepakt wordt door de eiwitten van het wild-type AAV. Aangezien de ingepakte vector de *rep* en *cap/AAP* genen mist, is deze nog steeds biologisch ingeperkt. Onder laboratoriumcondities is *in vivo* mobilisatie van AAV-vectoren door superinfectie met wild-type AAV en adenovirus tot op zekere hoogte mogelijk gebleken,⁸⁴ echter voor zover bij de COGEM bekend is bij medische of veterinaire toepassingen nog nooit mobilisatie van de vector of recombinitie van AAV-vectoren gerapporteerd. Gezien het bovenstaande is de COGEM van oordeel dat het milieurisico ten gevolge van complementatie verwaarloosbaar klein is.

In het theoretische geval dat er recombinitie optreedt tussen de ITR's van de vector en wild-type AAV, zullen de *rep* en *cap/AAP* sequenties van het wild-type AAV uitgewisseld worden met de expressiecassette van de vector. Hierbij ontstaan geen nieuwe virussen, maar wederom de vector of apathogeen wild-type AAV. De COGEM acht het risico ten gevolge van recombinitie met wild-type AAV daarom verwaarloosbaar klein.

Ook zou het AAV-vectorgenoom theoretisch gezien kunnen recombineren met het genoom van wild-type AAV waardoor een hybride genoom zou ontstaan. De COGEM wijst erop dat de 'packing capacity' van AAV-vectoren beperkt is: er kan maximaal 5,2 kb in een virusdeeltje worden ingepakt.²⁶ Zij acht daarom de kans dat er een virus met een hybride genoom ontstaat, verwaarloosbaar klein.

5.4 Conclusies

De COGEM concludeert op grond van bovenstaande overwegingen dat:

- AAV-vectoren geattenuëerd en biologisch ingeperkt zijn, en vanwege hun replicatiedeficiënte eigenschap niet in het milieu kunnen verspreiden. Dit is ongeacht het AAV species of serotype waarvan de vector is afgeleid.
- Incidentele waargenomen schadelijke effecten na toediening van AAV-vectoren hebben betrekking op de patiënt zelf. Deze effecten leiden niet tot een verhoogd milieurisico.
- AAV-vectoren kunnen na toediening uitgescheiden worden, maar vanwege hun biologische inperking is verdere verspreiding niet mogelijk.
- De kans dat AAV-vectoren via de kiembaan worden overgedragen is verwaarloosbaar klein.
- Indien een AAV-vector recombineert met wild-type AAV, of wild-type AAV een AAV-vector complementeert, zijn de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

6. Andere elementen van belang bij de milieurisicobeoordeling

6.1 Moleculaire karakterisering

In 2013 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over de genetische karakterisering van ggo's voor klinische toepassingen.⁸⁵ Conform dit advies, acht de COGEM het bij de moleculaire karakterisering van AAV-vectoren van belang dat de gehele nucleotidensequentie van het

vectorgenoom is vastgesteld, en dat deze ter verificatie (aan de hand van een 'alignment') is vergeleken met het beoogde product. Indien hieraan wordt voldaan, is de COGEM van oordeel dat een AAV-vector afdoende moleculair is gekarakteriseerd.^b

6.2 Orgaan- of weefseldonatie

AAV-vectoren kunnen gedurende lange tijd in de vorm van concatameren in lichaamscellen persisteren.^{10,70,71,72} De COGEM merkt op dat bij elke celdeling, de hoeveelheid vector verder zal verdunnen, maar dat dit bijvoorbeeld in de lever langzaam gaat. Via bloed-, weefsel- of orgaandonatie zou de vector op deze wijze onbedoeld naar derden doorgegeven kunnen worden. De COGEM signaleert dat overwogen moet worden of een patiënt donor kan zijn, en acht het van belang dat instanties, die betrokken zijn bij de beoordeling en uitvoering van klinische studies, in overleg treden over hoe om te gaan met de eventuele risico's bij deze vorm van transmissie en waar de verantwoordelijkheden hierover liggen.

7. Advies

Op grond van alle hierboven beschreven argumenten concludeert de COGEM dat het mogelijk is een generieke milieurisicobeoordeling op te stellen voor klinische toepassingen met AAV-vectoren. Vanwege het replicatiedeficiënte karakter van deze vectoren, en het feit dat alleen de ITR's van AAV nog maar aanwezig zijn, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij klinische studies met AAV-vectoren verwaarloosbaar klein zijn, mits aan een aantal randvoorwaarden wordt voldaan. Zij adviseert bij deze studies de volgende randvoorwaarden in acht te nemen:

- de ITR's en capsid-eiwitten zijn afkomstig van AAV's, dat wil zeggen virussen behorende tot het genus *Dependoparvovirus* die voor *in vivo* replicatie afhankelijk zijn van een helpervirus (zoals *Adeno-associated dependo-parvovirus A*, *Adeno-associated dependoparvovirus B*, *Avian dependoparvovirus 1*, *Chiropteran dependoparvovirus 1*, *Pinniped dependoparvovirus 1* en *Squamate dependoparvovirus 1*);
- indien ten behoeve van de vectorproductie gebruik is gemaakt van helpervirus, dient dit te zijn geïnactiveerd of verwijderd;
- de gehele nucleotidensequentie van het AAV-vectorgenoom is vastgesteld en dient ter verificatie te zijn vergeleken met de nucleotidensequentie van de beoogde vector.

8. Signalering

In het onderhavige advies is een generieke milieurisicobeoordeling opgesteld voor gebruik van AAV-vectoren in klinische studies. De COGEM merkt op dat AAV-vectoren replicatiedeficiënt zijn, en dat na toediening in de patiënt of proefpersoon verdere verspreiding in het milieu niet mogelijk is.

^b De COGEM gaat er vanuit dat alle handelingen voor de productie van de vectorbatch plaatsvinden volgens Good Manufacturing Practice (GMP), en dat wordt voldaan aan de eisen zoals gesteld in de European Pharmacopoeia ten einde identiteit, zuiverheid en steriliteit van de vectorbatch te waarborgen.

In de schriftelijke reactie van de minister van IenW⁸⁶ en bijlage daarbij,⁸⁷ op de inbreng van de Tweede Kamer tijdens het Algemeen Overleg Biotechnologie en Kwekersrecht van 25 april 2019, is opgemerkt dat in Nederland een vergunning voor gentherapie onder ingeperkt gebruik aangevraagd kan worden, mits afdoende kan worden onderbouwd dat het gebruikte ggo niet in het milieu terecht kan komen en daardoor geen risico's voor mens en milieu kunnen ontstaan.

De COGEM signaleert dat, gezien het feit dat bij klinische studies, waarbij gebruik gemaakt wordt van AAV-vectoren, geen verspreiding van het ggo in het milieu optreedt, deze studies in aanmerking kunnen komen voor vergunningen onder ingeperkt gebruik. Dit zou betekenen dat de vergunningverleningsprocedure voor dergelijke studies aanzienlijk verkort kan worden.

Referenties

1. Naso MF *et al.* (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a vector for gene therapy. *BioDrugs* 31: 317-334
2. Flotte T *et al.* (1996). A phase I study of an Adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum. Gene Ther.* 7: 1145-1159
3. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide (2018). www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/ (bezocht: 30 augustus 2019)
4. European Medicines Agency (EMA). EMEA/H/C/002145. The marketing authorisation for Glybera has expired following the marketing-authorisation holder's decision not to apply for a renewal. www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/glybera (bezocht: 30 augustus 2019)
5. European Medicines Agency (EMA). EMEA/H/C/004451. Luxturna; voretigene neparvovec. www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/luxturna (bezocht: 30 augustus 2019)
6. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 27 augustus 2019)
7. Zincarelli C *et al.* (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* 16: 1073-1080
8. Tijssen P *et al.* (2012). Family *Parvoviridae*. In: *Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
9. Gao G *et al.* (2003). Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *PNAS* 100: 6081-6086
10. Berns KI & Parrish CR (2013). *Parvoviridae*. In: *Fields virology, volume 2, 6th edition*. Edited by Knipe DM en Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
11. Gonçalves MA (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology J.* doi:10.1186/1743-422X-2-43
12. Berns KI & Muzyczka N (2017). AAV: An overview of unanswered questions. *Hum. Gene Ther.* 28: 308-313
13. Srivastava A & Carter BJ (2017). AAV Infection: Protection from Cancer. *Hum. Gene Ther.* 28: 323-327

14. Salganik M *et al.* (2015). Adeno-associated Virus as a Mammalian DNA Vector. *Microbiol. Spectr.* 3: doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0052-2014
15. Sonntag F *et al.* (2010). A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 10220-10225
16. Cotmore SF *et al.* (2019). *Parvoviridae*: The family. In: *Virus taxonomy, tenth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/parvoviridae (bezocht: 27 augustus 2019)
17. Zinn E & Vandenberghe LH (2014). Adeno-associated virus: Fit to serve. *Curr Opin Virol.* 0: 90–97
18. Hüser D *et al.* (2002). Kinetics and frequency of Adeno-associated virus site-specific integration into human chromosome 19 monitored by quantitative real-time PCR. *J. Virol.* 76: 7554-7559
19. McCarty DM *et al.* (2004). Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu. Rev. Genet.* 38: 819-845
20. Flotte TR & Berns KI (2005). Adeno-associated virus: A ubiquitous commensal of mammals. *Hum. Gene Ther.* 16: 401-407
21. Balakrishnan B & Jayandharan GR (2014). Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 14: 86–100
22. Colella P *et al.* (2018). Emerging issues in AAV-mediated *in vivo* gene therapy. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 8: 87-104
23. Srivastava A (2016). *In vivo* tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr. Opin. Virol.* 21: 75-80
24. Rabinowitz J *et al.* (2019). Adeno-associated virus (AAV) versus immune response. *Viruses* 11: 102-113. doi:10.3390/v11020102
25. McCarty DM (2008). Self-complementary AAV vectors; Advances and applications. *Mol. Ther.* 16: 1648-1656
26. Wu Z *et al.* (2010). Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging. *Mol. Ther.* 18: 80-86
27. Trapani I *et al.* (2014). Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors. *EMBO Mol. Med.* 6: 194–211
28. Trapani I *et al.* (2015). Improved dual AAV vectors with reduced expression of truncated proteins are safe and effective in the retina of a mouse model of Stargardt disease. *Hum. Mol. Genet.* 24: 6811–6825
29. Robert M-A *et al.* (2017). Manufacturing of recombinant adeno-associated viruses using mammalian expression platforms. *Biotechnol. J.* 12: 1600193. DOI 10.1002/biot.201600193
30. Clément N & Grieger JC (2016). Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials. *Mol. Ther. - Methods & Clin. Dev.* 3. doi: 10.1038/mtm.2016.2
31. Schnödt M & Büning H (2017). Improving the quality of adeno-associated viral vector preparations: the challenge of product-related impurities. *Hum. Gene Ther. Methods* 28: 101-108
32. Hauck B *et al.* (2009). Undetectable transcription of cap in a clinical AAV vector: implications for performed capsid in immune responses. *Mol. Ther.* 17: 144-152
33. Wright JF (2014). Product-related impurities in clinical-grade recombinant AAV vectors: characterization and risk assessment. *Biomedicines.* 2: 80-97

34. Martin J *et al.* (2013). Generation and characterization of Adeno-associated virus producer cell lines for research and preclinical vector production. *Hum. Gene Ther. Methods* 24: 252-269
35. Wang XS *et al.* (1998). Characterization of wild-type adeno-associated virus type 2-like particles generated during recombinant viral vector production and strategies for their elimination. *J. Virol.* 72: 5472–5480
36. Allen JM *et al.* (1997). Identification and elimination of replication-competent adeno-associated virus (AAV) that can arise by nonhomologous recombination during AAV vector production. *J. Virol.* 71: 6816–6822
37. Li C & Samulski RJ (2005). Serotype-specific replicating AAV helper constructs increase recombinant AAV type 2 vector production. *Virology* 335: 10–21
38. Emmerling VV *et al.* (2016). Rational plasmid design and bioprocess optimization to enhance recombinant adeno-associated virus (AAV) productivity in mammalian cells. *Biotechnol. J.* 11: 290-297
39. Lock M *et al.* (2010). Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale. *Hum. Gene Ther.* 21: 1259–1271
40. Maheswari G *et al.* (2004). Thermal inactivation of adenovirus type 5. *J. Virol. Methods* 118: 141-145
41. Zolotukhin S *et al.* (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.* 6: 973–985
42. Thorne BA *et al.* (2009). Manufacturing recombinant adeno-associated viral vectors from producer cell clones. *Hum. Gene Ther.* 20: 707–714
43. COGEM (2018). *Adeno-associated dependoparvovirus A en Adeno-associated dependoparvovirus B* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. COGEM advies CGM/180321-01
44. COGEM (2005). Gentherapie van lipoproteïne lipase (LPL) deficiënte patiënten met een adeno-associated virale vector coderend voor het LPL-eiwit (AMT-010). COGEM advies CGM/050530-01
45. COGEM (2018). Klinische studie met genetisch gemodificeerd Adeno-associated virus ter behandeling van patiënten met glycogeenstapelingsziekte type Ia (GSDIa). COGEM advies CGM/181231-02
46. COGEM (2017). Klinische studie met gg-AAV in patiënten met het Crigler-Najjar syndroom. COGEM advies CGM/170821-01
47. COGEM (2013). Een fase 2b klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met hartfalen. COGEM advies CGM/130603-01
48. COGEM (2015). Een fase I/II klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met een ernstige tot matig ernstige hemofilie B. COGEM advies CGM/150617-01
49. COGEM (2018). Klinische studie met een gg-AAV-FIX variant ter behandeling van patiënten met matige of ernstige hemofilie B. COGEM advies CGM/180625-01
50. COGEM (2018). Klinische studie met genetisch gemodificeerd Adeno-associated virus ter behandeling van patiënten met ernstige hemofilie A. COGEM advies CGM/181231-03
51. COGEM (2016). Klinische studie met genetisch gemodificeerd Adeno-associated virus ter behandeling van patiënten met reumatoïde artritis (LUMC). COGEM advies CGM/160719-02
52. COGEM (2019). Klinische studie met genetisch gemodificeerd Adeno-associated virus ter behandeling van patiënten met spinale musculaire atrofie. COGEM advies CGM/190429-01

53. BioPharma Dive (2019). With FDA decision near, Novartis bolsters SMA gene therapy case. www.biopharmadive.com/news/novartis-zolgensma-sma-strive-data-gene-therapy-patient-deaths/552873/ (bezoekt: 30 augustus 2019)
54. Reuters (2019). Second death in Novartis gene therapy trials under investigation. www.reuters.com/article/us-novartis-results-zolgensma/novartis-mulling-1-5-mln-5-mln-price-range-for-sma-gene-therapy-idUSKCN1S01O3 (bezoekt: 30 augustus 2019)
55. SWI swissinfo.ch (2019). Novartis says baby's death may be tied to gene therapy. www.swissinfo.ch/eng/novartis-says-baby-s-death-may-be-tied-to-gene-therapy/44914184 (bezoekt: 26 april 2019)
56. FiercePharma (2019). www.fiercepharma.com/pharma/infant-s-death-eu-zolgensma-trial-launches-novartis-internal-probe (bezoekt: 30 augustus 2019)
57. FiercePharma (2018). Novartis unveils investigation of infant's death in European Zolgensma trial. www.fiercepharma.com/pharma/infant-s-death-eu-zolgensma-trial-launches-novartis-internal-probe
58. SWI swissinfo.ch (2019). A \$2.1 million drug for a deadly childhood disease is approved by FDA www.swissinfo.ch/eng/a--2.1-million-drug-for-a-deadly-childhood-disease-is-approved-by-fda/44987894 (bezoekt: 30 augustus 2019)
59. Hinderer C *et al.* (2018). Severe toxicity in nonhuman primates and piglets following high-dose intravenous administration of an adeno-associated virus vector expressing human SMN. *Hum. Gene Ther.* 29: 285-298
60. Flotte TR & Büning H *et al.* (2018). Severe toxicity in nonhuman primates and piglets with systemic high-dose administration of adeno-associated virus serotype 9-like vectors: putting patients first. *Hum. Gene Ther.* 29: 283-284
61. Nathwani AC *et al.* (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 365: 2357-2365
62. Nathwani AC *et al.* (2014). Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 371: 1994-2004
63. Georg LA *et al.* (2017). Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX Variant. *N. Engl. J. Med.* 377: 2215-2227
64. Rangarajan S *et al.* (2017). AAV5-Factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 377: 2519-2530
65. Mendell JR *et al.* (2017). Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *New Engl. Med.* 377: 1713-1722
66. Young SM & Samulski RJ (2001) Adeno-associated virus (AAV) site-specific recombination does not require a Rep-dependent origin of replication within the AAV terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 13525-13530
67. Deyle DR & Russell DW (2009). Adeno-associated virus vector integration. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 11: 442-447
68. Donsante A *et al.* (2007). AAV Vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* 317: 477

69. Chandler RJ *et al.* (2015). Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J. Clin. Invest.* 125: 870-880
70. Chen ZY *et al.* (2001). Linear DNAs concatemerize *in vivo* and result in sustained transgene expression in mouse liver. *Mol. Ther.* 3: 403-410
71. Ehrhardt A *et al.* (2003). Episomal persistence of recombinant adenoviral vector genomes during the cell cycle *in vivo*. *J. Virol.* 77: 7689-7695
72. Bortolussi G *et al.* (2014). Life-long correction of hyperbilirubinemia with a neonatal liver-specific AAV-mediated gene transfer in a lethal mouse model of Crigler-Najjar Syndrome. *Hum. Gene Ther.* 25: 844-855
73. Kaeppl C *et al.* (2013). A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nature Med.* 19: 889-892
74. Tenenbaum L *et al.* (2003). Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr. Gene Ther.* 3: 545-565
75. Reuter JD *et al.* (2012). Assessment of hazard risk associated with the intravenous use of viral vectors in rodents. *Compar. Med.* 62: 361-370
76. Wang G *et al.* (2014). Assessment of toxicity and biodistribution of recombinant AAV8 vector-mediated immunomodulatory gene therapy in mice with Pompe disease. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 1:14018 doi: 10.1038/mtm.2014.18. eCollection 2014
77. Favaro P *et al.* (2009). Host and vector-dependent effects on the risk of germline transmission of AAV vectors. *Mol. Ther.* 17: 1022-1030
78. Manno CS *et al.* (2006). Successful transduction of liver in Hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* 12:342-347
79. Schuettrumpf J *et al.* (2006). Inadvertent germline transmission of AAV2 vector: findings in a rabbit model correlate with those in a human clinical trial. *Mol. Ther.* 213:1064-1073
80. Arruda VR *et al.* (2001). Lack of germline transmission of vector sequences following systemic administration of recombinant AAV-2 vector in males. *Mol. Ther.* 4: 586-592
81. Pañeda A *et al.* (2009). Effect of Adeno-associated virus serotype and genomic structure on liver transduction and biodistribution in mice of both genders. *Hum. Gene Ther.* 20: 908-971
82. Hüser D *et al.* (2017). High prevalence of infectious adeno-associated virus (AAV) in human peripheral blood mononuclear cells indicative of T Lymphocytes as sites of AAV persistence. *J. Virol.* 91. doi: 10.1128/JVI.02137-16
83. Miesbach W *et al.* (2018). Gene therapy with adeno-associated virus vector 5–human factor IX in adults with hemophilia B. *Blood* 131: 1011-1031
84. Afione SA *et al.* (1996). *In vivo* model of adeno-associated virus vector persistence and rescue. *J. Virol.* 70: 3235–3241.
85. COGEM (2013). Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing. COGEM advies CGM/130227-05
86. Kamerbrief minister IenW 'Reactie op inbreng Tweede Kamer tijdens AO Biotechnologie en Kwekersrecht op 25 april 2019' (20 juni 2019).
87. Bijlage bij de brief reactie op inbreng Tweede Kamer tijdens AO Biotechnologie en Kwekersrecht