

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

DATUM 24 maart 2021
KENMERK CGM/210324-02
ONDERWERP Advies generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met replicatie-deficiënte AdV-vectoren

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

De COGEM heeft, naar aanleiding van een adviesvraag over een brede vergunningaanvraag voor vaccinstudies met replicatie-deficiënte adenovirale (AdV)-vectoren, een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met replicatie-deficiënte AdV-vectoren opgesteld ten einde de vergunningverleningsprocedure voor deze studies te stroomlijnen.

Samenvatting:

Vectoren afgeleid van adenovirussen (adenovirale (AdV)-vectoren) zijn de meest gebruikte vectoren in klinische genterapiestudies. Er wordt een onderscheid gemaakt tussen vectoren die wel (replicatie-competent) en die niet (replicatie-deficiënt) kunnen repliceren.

De COGEM heeft verscheidene keren geadviseerd over klinische studies waarbij AdV-vectoren ingezet worden. Mede naar aanleiding van een brede vergunningaanvraag om replicatie-deficiënte AdV-vectoren te gebruiken voor klinische vaccinstudies, heeft de COGEM een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met deze vectoren opgesteld. Deze generieke milieurisicobeoordeling beperkt zich tot de replicatie-deficiënte AdV-vectoren, waarbij minimaal het zogenaamde E1-gebied uit het virale genoom is verwijderd.

Replicatie-deficiënte AdV-vectoren zijn geattenuëerd en biologisch ingeperkt, en kunnen vanwege hun replicatie-deficiënte eigenschap niet in het milieu verspreiden. De COGEM is van oordeel dat, gezien de eigenschappen van replicatie-deficiënte adenovirale (AdV)-vectoren, de risico's voor mens en milieu bij klinische studies met deze vectoren verwaarloosbaar klein zijn, mits aan een aantal randvoorwaarden voldaan wordt. Deze generieke milieurisicobeoordeling kan het vergunningverleningsproces voor klinische studies vereenvoudigen en stroomlijnen, omdat het als basis kan dienen voor het instellen van een vergunning onder vaste voorwaarden (VoV) voor deze toepassingen.



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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

- c.c.
- Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
DG Milieu en Internationaal
 - Dr. ir. M.M.C. Gielkens, Loket Gentherapie

Generieke milieurisicobeoordeling van replicatie-deficiënte adenovirale vectoren in klinische studies

COGEM advies CGM/210324-02

1. Inleiding

Bij klinische genterapiestudies behoren virale vectoren die afgeleid zijn van adenovirussen (AdV-vectoren) tot de meest toegepaste vectoren. Wereldwijd zijn er meer dan 500 klinische studies met AdV-vectoren uitgevoerd.¹ Voordelen van deze vectoren ten opzichte van andere vectoren zijn onder meer hun vermogen om een hoge transductie-efficiëntie en genexpressie (hoewel tijdelijk van aard) te bewerkstelligen, hun brede cel-tropisme en het feit dat deze vectoren zowel delende als niet-delende cellen kunnen transduceren.²

1.1 Generieke milieurisicobeoordeling

De COGEM heeft in 2018 een generiek advies uitgebracht over de inschaling van replicatie-deficiënte AdV-vectorsystemen onder ingeperkt gebruik.³ Replicatie-deficiënte AdV-vectoren zijn biologisch ingeperkt. De COGEM heeft in de afgelopen jaren verscheidene keren geadviseerd over klinische studies waarbij replicatie-deficiënte AdV-vectoren ingezet worden. Een brede aanvraag voor het gebruik van een replicatie-deficiënte AdV-vector afgeleid van humaan adenovirus type 26 (HAdV-26) in klinische vaccinatiestudies, al dan niet in combinatie met een Modified Vaccinia virus Ankara (MVA)-vector, vormt de aanleiding voor het opstellen van de onderhavige generieke milieurisicobeoordeling. In deze generieke milieurisicobeoordeling worden de randvoorwaarden voor klinische studies met replicatie-deficiënte AdV-vectoren gebaseerd op adenovirussen van humane oorsprong of afkomstig uit niet-humane primaten, beschreven.

Deze milieurisicobeoordeling kan de basis vormen om een vereenvoudigde vergunningprocedure (vergunning onder vaste voorwaarden, VoV) voor klinische studies met replicatie-deficiënte AdV-vectoren op te stellen. De voor de milieurisicobeoordeling relevante aspecten en informatie worden hieronder verder besproken.

2. Algemene eigenschappen adenovirussen

2.1 Taxonomie en typen adenovirussen

Adenovirussen behoren tot de familie van de *Adenoviridae* en komen voor bij gewervelde dieren, zoals zoogdieren, reptielen, amfibieën, vissen en vogels. De familie *Adenoviridae* omvat vijf genera (*Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus*, *Mastadenovirus* en *Siadenovirus*) en 80 soorten.⁴ Humane adenovirussen (HAdV) behoren samen met adenovirussen van andere zoogdieren (onder andere vlermuizen, runderen, honden, herten, dolfinen, paarden, muizen, schapen en niet-humane primaten) tot het genus *Mastadenovirus*. Dit genus omvat 50 soorten, waaronder 7 soorten HAdV genaamd *Human mastadenovirus A* tot en met *G*, en 9 adenovirussoorten afkomstig van niet humane primaten (SAdV), genaamd *Simian mastadenovirus A* tot en met *I*.⁴

Regelmatig worden er nieuwe adenovirussen ontdekt. Het definiëren van een nieuwe adenovirusstam gebeurde vroeger op basis van serologie; tegenwoordig worden nieuwe typen echter voornamelijk geïdentificeerd met behulp van genomische sequentie-analyse. De criteria voor het typeren van humane adenovirussen is constant in ontwikkeling en hierover bestaat geen consensus onder wetenschappers.⁵ Binnen de species worden adenovirussen verder onderverdeeld in serotypen of typen, die met een nummer worden aangegeven. Tot de soort *Human mastadenovirus A* behoren bijvoorbeeld HAdV type 12 en 18. Van HAdV worden op dit moment meer dan 100 verschillende typen onderscheiden.⁵

2.2 Structuur en genomische organisatie adenovirussen

Het genoom van adenovirussen bestaan uit een lineair dubbelstrengs DNA molecuul. De grootte van het genoom varieert tussen de 26 en 49 kilobaseparen (kbp) per species.

Het genoom is omgeven door een icosahedrische eiwitmantel.^{6,7,8} De deeltjes zijn ongeveer 70 tot 90 nm in diameter. De eiwitmantel van het virusdeeltje is opgebouwd uit drie ‘major’ capsid-eiwitten: proteïne II (hexon), III (pentonbase) en IV (fiber). Daarnaast zijn er meerdere ‘minor’ capsid-eiwitten aanwezig, zoals het IIIa, VI, en VIII. In het virusdeeltje van veel mastadenovirussen zit ook het structurele eiwit IX.^{7,8} In de pentonbasen zijn de fibers verankerd, die boven het manteloppervlak uitsteken. De fibers zijn opgebouwd uit een ‘tail’, ‘shaft’ en een ‘knob’ gedeelte, waarvan de ‘fiber knob’ bindt aan de receptor op de gastheer cel.^{6,7,8} De hexonen, pentonbasen en fibers bezitten antigene determinanten, en spelen een belangrijke rol bij de herkenning door het immuunsysteem.⁹ Er zijn meerdere receptoren geïdentificeerd voor HAdV. De ‘coxsackie and adenovirus receptor’ (CAR) wordt door bijna alle HAdV soorten gebruikt, met uitzondering van een aantal typen HAdV uit soort B die via CD46 de cellen infecteren.^{8,9} Daarnaast zijn er ook verschillende andere receptoren en co-receptoren bekend voor HAdV.^{8,9}

De ‘core’ van het virusdeeltje bestaat uit het DNA-genoom, met aan beide 5’-einden het covalent-gebonden ‘terminal protein’(TP), dat samen met de eiwitten V (alleen aanwezig in mastadenovirussen), VII, X (ook wel Mu of μ genoemd), IVa2, en het virale protease een complex vormt.^{6,7} Het dubbelstrengs DNA-genoom kan onderverdeeld worden in verschillende regio’s: het ‘packaging’ signaal ψ (psi), de zogenaamde ‘vroeg’ (Early of E) en ‘late’ (Late of L) regio’s, en de ‘inverted terminal repeats’ (ITR’s) aan beide uiteinden van het genoom. De ITR’s functioneren als ‘origin of replication’, vanwaar DNA replicatie van het genoom start. De TP-eiwitten fungeren daarbij als primer voor de replicatie.^{6,7}

De E-regio komt kort na binnenkomst van het virus in de cel tot expressie en bestaat uit verschillende transcriptie-units die elk voor meerdere eiwitten coderen: E1A, E1B, E2A, E2B, E3 en E4.^{6,10}

De E1A-eiwitten zijn betrokken bij de inductie van de virusreplicatie en expressie van de overige E-genen, en bij het controleren van de celcyclus. De E1B-eiwitten remmen de geprogrammeerde celdood (apoptose) van de geïnfecteerde cel.^{6,9,10} De aanwezigheid van de E1-regio in het virale genoom is essentieel voor replicatie van het virale genoom. Mastadenovirussen brengen daarnaast aan het 3’ uiteinde van de E1-regio het ‘minor’ capsid-eiwit pIX tot expressie. Dit eiwit maakt deel uit van de eiwitmantel van het virusdeeltje, en is onder meer betrokken bij de stabilisatie van het virusdeeltje (het draagt bij aan de robuustheid van het capsid), regulatie van transcriptie en speelt een rol bij reorganisatie van eiwitten in de celkern.¹¹

De E2A- en E2B-eiwitten zijn noodzakelijk voor replicatie van het virale genoom: E2A codeert voor het enkelstrengs DNA bindende eiwit (DBP), en E2B voor het DNA-polymerase en de 'precursor' van het TP eiwit (pTP).^{6,10} De E3-eiwitten inhiberen de antivirale respons van de gastheer die optreedt na infectie en blokkeren de ontstekingsreactie tegen het virus, onder meer door de functie van 'natural killer' (NK-) cellen, cytotoxische T-lymfocyten en 'tumor necrosis factor' (TNF) tegen te werken. Adenovirussen met een deletie in de E3-regio zijn voor zover bekend nooit aangetroffen onder natuurlijke omstandigheden, waardoor verondersteld wordt dat virussen met deze deletie niet kunnen overleven in het milieu. De E4-regio codeert voor eiwitten die betrokken zijn bij het controleren van de celcyclus en bij de expressie van de L-regio.^{6,9}

De L-regio bevat genen die coderen voor structurele eiwitten die nodig zijn voor de opbouw van het virusdeeltje.^{6,9} Het 'packaging' signaal ψ is betrokken bij het inpakken van het virale genoom in het virusdeeltje.⁶

Een groot deel van de adenovirale infectiecyclus vindt plaats in de celkern van de gastheer, waaronder de expressie van de E-regio, virale DNA replicatie, expressie van de 'late' virale genen, alsook de assemblage en maturatie van het nieuwe virusdeeltje. De nieuwe virusdeeltjes komen vrij na lysis van de cel.^{6,9}

2.3 Pathogeniteit en transmissie van adenovirussen

Adenovirussen kunnen verspreiden door direct contact, via hoesten of niezen, of via geïnfecteerde objecten of oppervlakten. Sommige adenovirussen kunnen ook via de oraal/fecale route verspreiden. Adenovirussen kunnen ook via water verspreiden (bijvoorbeeld in zwembaden), maar dit komt minder vaak voor.¹²

HAdV infecteren in het algemeen de bovenste en lagere luchtwegen, maar ook conjunctivitis en infecties van het maagdarmkanaal komen regelmatig voor. In mindere mate worden blaas en lever geïnfecteerd.⁹ Meer dan 80% van de gediagnosticeerde infecties worden waargenomen in kinderen jonger dan 4 jaar.¹³ Een infectie met HAdV is meestal zelf-limiterend en leidt tot milde klachten, hoewel er gevallen van ernstige ziekte met soms fatale afloop zijn gerapporteerd.¹⁴ In immuun-gecompromitteerden is HAdV infectie geassocieerd met verhoogde morbiditeit en mortaliteit.^{9,14} Soms kan HAdV persistent aanwezig blijven, waarbij gedurende een lange periode een lage hoeveelheid virus uitgescheiden wordt.¹⁵ Er is geen specifieke therapie tegen adenovirale infecties voorhanden.

Adenovirussen worden in het algemeen alleen pathogeen geacht voor hun specifieke gastheer.⁹ Adenovirale infecties die voorkomen bij dieren vertonen een vergelijkbare reeks van symptomen zoals gezien wordt bij humane adenovirusinfecties. Zo zijn adenovirussen die voorkomen in niet-humane primaten (SAdV), in het algemeen niet geassocieerd met ernstige ziekte in deze dieren.^{16,17} Voor zover bekend circuleren adenovirussen afkomstig uit niet-humane primaten niet in de humane populatie. Er zijn wel enkele gevallen beschreven waarbij zoönotische (van dier naar mens) of zoöantroponotische (van mens naar dier) transmissie heeft plaatsgevonden, maar hierbij zijn geen ernstige ziekteverschijnselen waargenomen.¹⁸

3. AdV-vectoren in klinische studies

AdV-vectoren van humane oorsprong zijn de meest gebruikte vectoren in klinische genterapiestudies.¹ De vectoren worden gebruikt om een gerepareerde versie van een gen te bezorgen bij genetische ziekten, als vaccin waarbij beoogd wordt een immuunrespons tegen pathogenen op te wekken, of als behandeling tegen kanker. In het laatste geval gebruikt men meestal replicerende AdV-vectoren, zogenaamde oncolytische vectoren, die ontworpen zijn om kankercellen te infecteren en door middel van een lytische infectiecyclus te vernietigen.¹⁹ Replicatie-competente AdV-vectoren vallen buiten dit generieke advies, dat beperkt is tot een generieke milieurisicobeoordeling voor replicatie-deficiënte AdV-vectoren.

Vanwege het feit dat de werkzaamheid van AdV-vectoren gehinderd kan worden door de aanwezigheid van immuniteit tegen een aantal veel voorkomende humane adenovirale virussen, zoals bijvoorbeeld HAdV-5, is men continu op zoek naar 'zeldzame' adenovirussen die als 'backbone' van AdV-vectoren kunnen dienen. Voorbeelden hiervan zijn vectoren gebaseerd op HAdV-26 en HAdV-35,^{20,33} of vectoren afgeleid van adenovirussen geïsoleerd uit niet-humane primaten.²¹

Bij replicatie-deficiënte AdV-vectoren is minimaal het E1-gebied uit het virale genoom verwijderd, waardoor de vectoren niet in staat zijn zelfstandig te repliceren en biologisch ingeperkt zijn. Afhankelijk van de type vector zijn, naast de E1-deletie (DE1), meerdere transcriptie-units binnen de E-regio verwijderd ($\Delta E2A$, $\Delta E2B$, $\Delta E3$, $\Delta E4$) of zijn alleen beide ITR's en het 'packaging' signaal nog aanwezig. Voor de productie van deze vectoren wordt gebruik gemaakt van een productieceldlijn die de ontbrekende virale eigenschappen die nodig zijn voor het produceren van vectordeeltjes *in trans* complementeert.

Er worden drie verschillende replicatie-deficiënte AdV-vectoren onderscheiden^{3,9,10}:

- Eerste generatie replicatie-deficiënte AdV-vectoren. Deze vectoren bezitten een deletie van de essentiële E1-regio ($\Delta E1$ -AdV); aanvullend kan (een gedeelte) van de E3-regio zijn verwijderd ($\Delta E1\Delta E3$ -AdV). De productie van eerste generatie AdV-vectoren vindt plaats in een complementerende cellijn waarin de E1-genen tot expressie komen. De functie van E3-regio (blokkade van de immuunrespons tegen het virus) hoeft niet door de productieceldlijn te worden gecompenseerd, omdat de E3 genen niet voor eiwitten coderen die voor vectorproductie noodzakelijk zijn.^{6,9,10} Het transgen is in veel gevallen geïnsereerd op de positie van de E1-regio, maar kan ook in de E3-regio in het genoom zijn geplaatst.

Voor de productie van eerste generatie vectordeeltjes zijn diverse productiecellijnen ontwikkeld. Deze cellijnen verschillen ten aanzien van de sequenties van de ingebrachte E1-regio, en de gebruikte regulatiesignalen (de promotor en het poly A-sigitaal) om de E1-regio tot expressie te brengen. Bij sommige productiesystemen zijn het E1A en E1B gen op verschillende locaties in het genoom van de cellijn ingebracht. De meest gebruikte productiecellijnen zijn HEK293, 911 en PER.C6.^{10,22}

- Tweede generatie replicatie-deficiënte AdV-vectoren. In deze vectoren zijn, naast een deletie van de E1-regio (en eventueel E3), ook deleties in de E2A, E2B en/of E4 regio's aanwezig

($\Delta E2A$, $\Delta E2B$, $\Delta E4$). Hierdoor vindt er geen replicatie van het virale genoom en geen expressie van de ‘late’ genen plaats,^{9,10} en wordt de capaciteit ten behoeve van het kloneren van transgenen vergroot. Productiecellijnen van tweede generatie AdV-vectoren complementeren naast de E1- ook de E2A-, E2B- en E4- functies. Deze cellijnen zijn vaak afgeleid van de productiecellijnen die gebruikt worden voor de eerste generatie AdV-vectoren.²²

- Helper afhankelijke (‘helper dependent’, HD) vectoren: In deze vectoren zijn alleen de ITR’s en het ‘packaging’ signaal ψ (psi) van het adenovirus aanwezig.^{9,10,26,27} Sommige vectoren bevatten ook nog een klein stuk niet-coderende sequentie van het ‘rechter deel’ van het AdV-genoom.²³ De rest van het genoom van de HD-vectoren bestaat uit de expressiecassette(s) met de transgen(en) van interesse. Eventueel wordt het genoom aangevuld met niet-coderend ‘stuffer’ DNA. Het vectorgenoom moet namelijk voldoen aan een bepaalde minimale en maximale lengte, ten einde in de virusmantel ingepakt te kunnen worden.^{10,23,24,25} Deze vectoren worden ook wel ‘high-capacity’, ‘gutless’ of ‘guttled’ vectoren genoemd.

Een productiecellijn voor HD AdV-vectoren moet de functies van alle essentiële adenovirale genen complementeren opdat er vectordeeltjes gegenereerd kunnen worden.^{10,23} Aangezien de constitutieve expressie van een aantal adenovirale genproducten in een cel leidt tot cytotoxische effecten, worden HD-vectoren geproduceerd in aanwezigheid van een complementerende helpervector.^{10,19,23,26,27} In de meeste gevallen fungeert een $\Delta E1\Delta E3$ AdV-vector als helpervector, waarbij de productie plaatsvindt in een cellijn die de E1-eiwitten van AdV tot expressie brengt.²³ De aanwezigheid van E3 in de helpervector leidt echter tot een hogere productie.²⁸ Om contaminatie met helpervector tijdens de productie tegen te gaan, wordt veelal gebruik gemaakt van een ‘site-specific’ recombinatiesysteem, zoals het Cre-*loxP* systeem. Bij dit systeem bevat de helpervector *loxP*-sequenties aan weerszijden van het ‘packaging’ signaal. Na expressie van cre-recombinase door de helpercellen, of vanaf het genoom van de helpervector, wordt het ‘packaging’ signaal uit het helpervectorgenoom verwijderd, waardoor het niet in een virusdeeltje ingepakt kan worden.^{26,29,30} Hoewel de hoeveelheid verontreiniging van helpervector sterk gereduceerd kan worden met behulp van Cre-*loxP* en vergelijkbare systemen, tot minder dan 0,1-0,4%,³¹ is altijd een verdere zuiveringsstap, bijvoorbeeld door een ‘density gradient’ nodig om de hoeveelheid helpervector verder te verkleinen.²³

Bij $\Delta E1$ en $\Delta E3$ AdV-vectoren kan een zogenaamde ‘leaky’ expressie optreden van de overgebleven ‘early’ en ‘late’ adenovirale genen, die kan leiden tot een sterke immuunrespons tegen de geïnfecteerde cellen.¹⁹ Deze eerste generatie AdV-vectoren worden daarom veelal gebruikt als vaccin, waarbij beoogd wordt een immuunrespons te bewerkstelligen in de gevaccineerde persoon die leidt tot bescherming tegen infectieziekten.^a Ook zijn eerste generatie AdV-vectoren ingezet als anti-tumortherapie,

^a Op dit moment zijn drie vaccins op de markt toegelaten die gebaseerd zijn op replicatie-deficiënte AdV vectoren. Zabdeno van Johnson & Johnson wordt in combinatie met een op Modified Vaccinia virus Ankara (MVA)-gebaseerd vaccin, gebruikt ter preventie van Ebola. Net als het vaccin tegen SARS-CoV-2 van hetzelfde bedrijf is Zabdeno afgeleid van HAdV type 26, waarbij E1 en een groot gedeelte van E3 zijn verwijderd. Ook het SARS-CoV-2 vaccin van AstraZeneca is een eerste generatie AdV-vector; deze is afgeleid van het Chimpanse adenovirus Y25 (ChAdY25).

bijvoorbeeld door het tumorantigen p53 tot expressie te brengen in kankercellen.^b Hoewel er ook klinische studies hebben plaatsgevonden met deze AdV-vectoren als gentherapie¹⁹, acht men Δ E1 AdV-vectoren niet optimaal voor gentherapie. De eerdergenoemde ‘leaky’ expressie die leidt tot de mogelijkheid dat de getransduceerde cellen worden opgeruimd, staat langdurige transgenexpressie in de weg.¹⁹ HD AdV-vectoren, waarbij alle AdV genen zijn verwijderd, zijn in staat voor langere tijd episomaal in de cellen aanwezig te blijven.²³

3.1 Hybride vectoren

In sommige gevallen worden replicatie-deficiënte vectoren geconstrueerd waarbij één of meerdere genen tussen verschillende typen of soorten AdV zijn uitgewisseld. Deze ‘hybride’ vectoren zijn bijvoorbeeld ontwikkeld om productie van de betreffende replicatie-deficiënte AdV-vectoren in de bestaande productiecellen, die meestal de E1-eiwitten afkomstig van HAdV type 5 tot expressie brengen, te optimaliseren. Door bijvoorbeeld het uitwisselen van de E4 ORF6 sequentie in Δ E1-AdV vectoren afgeleid van HAdV-26 of HAdV-35 met de overeenkomstige sequentie afkomstig HAdV-5, wordt de productie van deze vectoren in PER.C6 cellen (waarin de E1-regio van HAdV5 aanwezig is) geoptimaliseerd.^{22,32,33} Er kunnen ook door uitwisseling delen van fibers of hexonen van een ander adenovirus in de vector-backbone worden geïntroduceerd (zogenaamde ‘hexon/fiber swabs’), met als doel het tropisme van de AdV-vector aan te passen of de al aanwezige immuniteit tegen de vector te omzeilen.^{34,35,36} Het weefsel-tropisme van AdV-vectoren kan ook worden aangepast door de insertie van een Arginine-Glycine-Aspartaat (RGD)-bevattende peptide in de ‘fiber knob’.^{37,38}

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft alle adenovirussen waarover zij tot nu toe advies heeft uitgebracht, ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.³⁹ In 2018 heeft zij een generiek advies uitgebracht over de inschaling van werkzaamheden (productie van en *in vitro* en *in vivo* handelingen) met replicatie-deficiënte adenovirale vectorsystemen onder ingeperkt gebruik.³ Daarbij heeft de COGEM de laboratoriumwerkzaamheden met vectorsystemen in afwezigheid van replicatie-competent adenovirus ingeschaald op ML-I niveau. Daarnaast heeft de COGEM meerdere malen geadviseerd over klinische studies met replicatie-deficiënte adenovirussen.^{40,41,42,43}

Onder een versnelde beoordelingsprocedure heeft de European Medicines Agency (EMA) het op AdV gebaseerde Ebola vaccin Ad26.ZEBOV-GP tot de Europese markt toegelaten.⁴⁴ De COGEM heeft over deze markttoelating in 2019 een (vertrouwelijk)^c positief advies uitgebracht.⁴⁵ In 2020 heeft de COGEM geadviseerd over een vaccinstudie met Ad26COVS1, die viel onder de spoedregeling met een verkorte vergunningsprocedure voor gentherapie gericht op de bestrijding van COVID-19.⁴⁶ In twee (vertrouwelijke)^c adviezen heeft de COGEM begin 2021 geoordeeld dat de milieurisico’s van de

^b Een voorbeeld hiervan is Gendicine, een replicatie-deficiënte Δ E1- en Δ E3-AdV vector met een functioneel p53 gen als transgen, dat in 2003 in China door de State Food and Drug Administration goedgekeurd is voor commercieel gebruik.

^c Het betreft hier een advies over een vergunningaanvraag voor markttoelating van een medische toepassing in de EU. Dergelijke dossiers en vergunningaanvragen worden in zijn geheel als vertrouwelijk verklaard door de European Medicines Agency (EMA). Conform de EMA richtlijnen mogen COGEM adviezen niet gepubliceerd of op een andere wijze openbaar gemaakt worden.

markttoelating van twee vaccins tegen SARS-CoV-2, van AstraZeneca en van Janssen-Cilag, verwaarloosbaar klein zijn.^{47,48}

5. RCA-vorming bij de productie van replicatie-deficiënte AdV-vectoren

Voor de productie van replicatie-deficiënte adenovirale vectoren wordt gebruik gemaakt van productiecellijnen waarin de voor de replicatie benodigde adenovirale eiwitten tot expressie gebracht worden. Afhankelijk van het ontwerp van de vector in combinatie met de gebruikte productiecellijn, is er een kans op de vorming van replicatiecompetent adenovirus (RCA). Hieronder wordt voor de verschillende typen vectoren nader ingegaan op RCA-vorming.

5.1 Kans op RCA-vorming bij de productie van eerste generatie AdV-vectoren

Indien er gebruik gemaakt wordt van een eerste generatie productiesysteem (productie $\Delta E1$ -AdV of $\Delta E1\Delta E3$ -AdV-vectoren), kan na recombinatie van de E1-regio RCA gevormd worden. Het RCA zal in het geval van de $\Delta E1$ vector nagenoeg gelijk zijn aan een wildtype adenovirus. In het geval van de $\Delta E1\Delta E3$ -vector, zal het gevormde RCA sterk geattenuëerd zijn vanwege het ontbreken van de E3-regio.^{10,49} Indien er een transgen in de E3-regio is geïntroduceerd, zal het gevormde RCA het transgen bevatten. Wanneer er gebruik is gemaakt van vector-backbones samengesteld uit verschillende adenovirussen, zal er bij RCA-vorming een hybride virusdeeltje ontstaan.

Bij sommige productiesystemen is er geen sequentie-overlap tussen de E1-regio's van de vector en cellijn, waardoor er geen homologe recombinatie kan optreden en de kans verwaarloosbaar klein is dat er RCA ontstaat. Dit geldt bijvoorbeeld voor de meeste $\Delta E1$ -AdV vectoren wanneer deze in PER.C6 cellijnen geproduceerd worden, waarin de E1-genen onder de controle staan van de humane phosphoglycerate kinase (PGK) promotor.^{10,50} Gao *et al.* (2000) en Schiedner *et al.* (2000) hebben dit proefondervindelijk voor vergelijkbare systemen bevestigd.^{10,51,52} Een aandachtspunt is dat er geen enkele sequentie-overlap tussen de AdV-vector en de productiecellijn aanwezig mag zijn om recombinatie volledig uit te kunnen sluiten. Beschreven is bijvoorbeeld dat recombinatie optrad tijdens de productie van een eerste generatie $\Delta E1$ -AdV-vector in PER.C6 cellen, doordat een sequentie van 177 nucleotiden aan de 3' uiteinde van E1B uit de vector overeenkwam met de sequentie in PER.C6 cellen.⁵³

5.2 Kans op RCA-vorming bij de productie van tweede generatie AdV-vectoren

In tweede generatie AdV-vectoren zijn, naast de E1-regio, de E2A-, E2B- en/of E4-regio's verwijderd. Voor replicatie van het vectorgenoom zijn echter de transcriptie-units van E1, E2A, E2B en E4 noodzakelijk. Bij tweede generatie AdV-vectoren zouden daarom meerdere recombinaties moeten optreden tijdens de productie om RCA te vormen. De kans op het optreden van meerdere recombinaties is verwaarloosbaar klein. Als er recombinatie optreedt, zullen er daarom nieuwe replicatie-deficiënte vectoren worden gevormd, waarin slechts één van de genoemde regio's geherintroduceerd is.

5.3 Kans op RCA-vorming bij HD AdV-productiesystemen

Voor HD-vectoren geldt dat geen RCA kan ontstaan tijdens de productie door middel van homologe recombinatie, omdat het vectorgenoom alleen bestaat uit de ITR's en het 'packaging' signaal. Echter,

de kans op het ontstaan van RCA vanuit de helpervector is niet uitgesloten. Meestal maakt men gebruik van eerste generatie $\Delta E1/\Delta E3$ AdV-vectoren als helpervector, hoewel ook helpervectoren gebruikt kunnen worden waar alleen het E1-gebied is verwijderd, of het E1- en het E2-gebied. De kans op de vorming van RCA voor de helpervector is afhankelijk van de gebruikte helpervector en in combinatie met de productiecellijn, zoals beschreven in paragraaf 5.1 ('Kans op RCA-vorming bij de productie van eerste generatie AdV-vectoren').

6. Overwegingen

Bij de milieurisicobeoordeling van klinische studies staat de vraag centraal of mensen of dieren die niet aan de studie deelnemen ('derden') met de AdV-vector of daarvan afgeleide sequenties geïnfecteerd kunnen worden en daar nadelige gevolgen van kunnen ondervinden. De eventuele milieurisico's zijn gerelateerd aan de pathogeniteit van de vector, de mogelijke verspreiding van de vector in het milieu, en de mogelijke vorming van nieuwe recombinante virussen door eventuele recombinitie tijdens de productie van de vectoren of in de ontvanger. Dit generieke advies beschrijft de randvoorwaarden voor replicatie-deficiënte AdV-vectoren gebaseerd op adenovirussen van humane oorsprong of afkomstig uit niet-humane primaten. Hieronder wordt nader ingegaan op de factoren die van invloed zijn voor een generieke milieurisicobeoordeling van deze vectoren.

6.1 Pathogeniteit van replicatie-deficiënte adenovirale vectoren

Replicatie-deficiënte AdV-vectoren worden veelal gebruikt als vaccin tegen infectieziekten, maar kunnen ook ingezet worden als behandeling tegen kanker, cardiovasculaire en genetische ziekten.⁵⁴ Vanwege de deletie van het E1-gebied zijn eerste en tweede generatie AdV-vectoren, net als de HD-vectoren, replicatie-deficient en niet in staat zelfstandig te repliceren. Door de aanwezigheid van één of meerdere additionele deleties, kunnen de vectoren verder geattenuëerd zijn. Dit geldt met name voor de tweede generatie AdV-vectoren en de HD vectoren, maar ook voor eerste generatie vectoren wanneer naast de E1-deletie, ook het E3-gebied uit het genoom verwijderd is.

6.1.1 Mogelijke schadelijke effecten

Er is wereldwijd veel kennis opgedaan met AdV-vectoren in genterapie studies. De manier waarop de vector toegediend wordt, kan van invloed zijn op de bijwerkingen die gerapporteerd worden. In diverse vaccinstudies worden AdV-vectoren in het algemeen goed getolereerd.^{e.g.,55,56,57} Lokale toediening van replicatie-deficiënte vectoren gaat in het algemeen gepaard met relatief weinig en vaak milde zelflimiterende klinische symptomen, zoals koorts, spier- en gewrichtspijn. Bij systemische toediening van replicatie-deficiënte AdV-vectoren kunnen de bijwerkingen is sommige gevallen ernstiger zijn.¹⁹

Voor zover bekend is er tot nu toe slechts één geval waarbij genterapie met een AdV-vector een fatale afloop kende. Het betrof een 18-jarige patiënt met ornithine transcarbamylase (OTC) deficiëntie die een replicatie-deficiënte AdV-vector (HAdV5 met deletie in het E1- en E4-gebied) systemisch kreeg toegediend. De patiënt ontwikkelde een systemische ontstekingsreactie na infusie van de AdV-vector in de bloedbaan, gevolgd door multi-orgaanfalen en overleed 98 uur na toediening van de vector.⁵⁸ Het is niet geheel duidelijk waarom deze patiënt in tegenstelling tot andere patiënten een extreme reactie op

de vector had. Als mogelijke oorzaken wordt gedacht aan een genetische predispositie voor een overactief immuunsysteem, of een verhoogde immunorespons door eerdere blootstelling aan het adenovirus waarop de vector is gebaseerd.⁵⁹

Daarnaast is bij twee klinische studies, waarin onderzoek gedaan werd naar HAdV5-vectoren als vaccin tegen HIV-1 infectie, gebleken dat de kans om HIV-1 op te lopen hoger was in gevaccineerde mannen die voorafgaand aan de studie immuniteit hadden opgebouwd tegen HAdV5.^{60,61} Verondersteld wordt dat deze verhoogde kans op infectie veroorzaakt werd door de immunoreactie tegen de HAdV5-vector, onder meer doordat de specifieke CD4 T-cellen die door de HAdV5-vector worden opgewekt een verhoogde gevoeligheid hebben voor HIV.^{62,63,64}

Tijdens het schrijven van dit generieke advies, werd het gebruik van het COVID-19 vaccin van AstraZeneca in Nederland en in meerdere andere Europese landen tijdelijk opgeschort na enkele meldingen van de combinatie van ernstige verschijnselen van stolselvorming en een verlaagd aantal bloedplaatjes bij volwassenen na vaccinatie.⁶⁵ Dit vaccin is gebaseerd op het Chimpanzee AdV ChAdV Y25, en brengt het Spike-gen van SARS-CoV-2 tot expressie. Inmiddels hebben het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen (CBG) en de EMA geconcludeerd dat een mogelijk verband tussen deze zeer zeldzame ziekteverschijnselen (ten tijde van het schrijven van dit advies 25 gevallen op meer dan 20 miljoen gevaccineerden binnen Europa)⁶⁶ en het gebruikte AdV-vaccin niet uitgesloten is, maar dat de kans op deze verschijnselen extreem klein is en dat de voordelen in de vorm van bescherming tegen COVID-19 vele malen groter zijn dan de risico's.⁶⁷ Het vaccineren met dit vaccin is inmiddels hervat.⁶⁸

Naast de eigenschappen van de vector zelf, dient bij de risicobeoordeling van recombinante AdV-vectoren rekening gehouden worden met de eventuele schadelijke effecten van het geïnsereerde gen(product), bijvoorbeeld bij transgenen geassocieerd met virulentie, toxines of cytokines, of herstel van de verloren functies. De COGEM merkt hierbij op dat potentiële gezondheidsrisico's c.q. schadelijke effecten van AdV-vectoren ten eerste een risico voor de ontvanger vormen. Of deze effecten ook kunnen optreden bij derden is immers afhankelijk van de mate van verspreiding en blootstelling van derden aan de AdV-vectoren (zie paragraaf 6.2).

6.1.2 Integratie van vector genoom in gastheergenoom

In het adenovirusgenoom ontbreken sequenties die actieve integratie in het gastheergenoom mogelijk maken.⁶⁹ Echter, in zeldzame gevallen kan (passieve) integratie van het adenovirale genoom in het gastheergenoom optreden.⁷⁰ Dit is beschreven na inoculatie van hamsters met humane adenovirussen (met name HAdV12, maar ook HAdV18 en 31),⁷¹ waarbij integratie in het genoom in de meeste gevallen (70-90%) leidt tot tumorvorming.^{72,73} Een voorwaarde hiervoor is dat er geen lytische infectie optreedt, zoals gebruikelijk is bij infectie door wildtype adenovirussen. Hamstercellen zijn niet-permissief voor HAdV12; replicatie van het HAdV12 genoom wordt hierin geblokkeerd en hierdoor kunnen de geïnfecteerde cellen langere tijd overleven.⁷²

Uit verschillende *in vitro* studies blijkt dat integratie van het replicatie-deficiënte vectorgenoom met een frequentie van 0,0001-1% kan integreren in verschillende gastheercellijnen onder experimentele omstandigheden.^{74,75} In dierstudies waarbij een replicatie-deficiënte AdV-vector intraveneus is

toegediend en vectorsequenties in de eierstokken en testes van muizen gedetecteerd zijn, werden in de volgende generatie geen aanwijzingen gevonden voor overdracht door chromosomale integratie in kiemcellen.⁷⁶ Ook wanneer de AdV-vector geïnjecteerd werd in de testis of epididymis van de muis is geen kiembaanintegratie waargenomen.⁷⁷

AdV-vectoren worden wereldwijd al lange tijd veelvuldig toegepast in klinische studies. Voor zover bekend zijn er nooit meldingen geweest van het ontstaan van tumoren in klinische studies door genomintegratie van AdV-vectoren.

6.2 Verspreiding van de AdV-vector en blootstelling van derden

6.2.1 Biodistributie en uitscheiding van AdV-vectoren

De mate van uitscheiding na toediening van replicatie-deficiënte AdV-vectoren is in het algemeen beperkt vanwege de replicatie-deficiënte eigenschap van de vectoren. In een overzichtsartikel uit 2007 waarbij gekeken is naar uitscheiding van verschillende vectoren in klinische studies is aangegeven dat in 21 van de 50 gepubliceerde studies geen uitscheiding van replicatie-deficiënte AdV-vectoren waargenomen is bij verschillende toedieningsroutes (o.a. intratumor, intranasaal/inhalatie, intramusculair, intrapleuraal).⁷⁸ De biodistributie van vectorsequenties is afhankelijk van de toedieningsroute; bij toediening via de neus of door inhalatie worden in sommige klinische studies korte tijd vectorsequenties aangetoond in speeksel en nasofaryngeale vloeistof, en na intratumor injectie kunnen in sommige gevallen vectorsequenties in bloed (gerelateerde) producten aangetroffen worden.⁷⁸ Langdurige aanwezigheid van vectorsequenties is gerapporteerd bij behandeling met een AdV-vector via aerosolen (inhalatie) of nasale toediening (21 dagen)⁷⁹ of intratumor in een longtumor (90 dagen).^{80,81} 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 vectordeeltjes betreft.

In verschillende vaccinstudies met replicatie-deficiënte HAdV5-, HAdV26- of HAdV35-vectoren als potentiële vaccins tegen verschillende ziekten, is na intramusculaire toediening geen uitscheiding van de vectoren in respiratoire monsters en urine waargenomen.^{82,83,84,85} In een andere studie waarbij de veiligheid van verschillende $\Delta E1/\Delta E3$ vectoren is onderzocht in 90 personen via verschillende toedieningsroutes, is 1 van de 1685 monsters (faryngeaal weefsel) positief getest op de aanwezigheid van de AdV-vector, 2 dagen na nasale toediening.⁸⁶

De COGEM is van oordeel dat uitscheiding van AdV-vectoren zeer beperkt (en kortdurend) tot afwezig zal zijn. AdV-vectoren die in het milieu worden uitgescheiden, zijn biologisch ingeperkt en zullen zich niet verder verspreiden. Wanneer het (product van het) transgen niet bijdraagt aan herstel van geattenueerde eigenschappen of de replicatie-incompetente eigenschap van de vector complementeert, acht de COGEM de kans op verdere verspreiding van AdV-vectoren onder mens of dier ten gevolge van eventuele uitscheiding verwaarloosbaar klein. Daarnaast wijst de COGEM erop dat bij het hanteren van standaard hygiënemaatregelen binnen en buiten het ziekenhuis, de kans op blootstelling van derden aan

het ggo verder beperkt wordt. De COGEM wijst erop, dat indien er toedieningsvormen worden gebruikt of ontwikkeld waarbij er wel een kans is op blootstelling van derden tijdens de toediening of door latere uitscheiding, aanvullende maatregelen genomen dienen te worden die de kans daarop tegen gaan. Tevens wijst de COGEM erop dat de blootstelling van derden aan vectordeeltjes aanzienlijk minder zal zijn dan in eerste instantie aan de proefpersoon is toegediend.

6.2.2 Vorming van replicatie-competent adenovirus (RCA)

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 replicatiecompetente virussen gevormd kunnen worden die zich verder kunnen verspreiden.

Mogelijkheid tot RCA-vorming tijdens de productie

Tijdens de productie van replicatie-deficiënte AdV-vectoren en HD-vectoren, bestaat de kans dat er door middel van homologe recombinatie RCA wordt gevormd, zoals beschreven in paragraaf 5 ('RCA-vorming bij de productie van replicatie-deficiënte AdV-vectoren'). Bij de productie van een eerste generatie AdV-vector of een HD-vector waarbij gebruik wordt gemaakt van een (helper)vector/cellijncombinatie zonder sequentie-overeenkomst in de E1-regio, en bij de productie van een tweede generatie AdV-vector, is de COGEM van oordeel dat de kans op RCA-vorming verwaarloosbaar klein is. Indien de vorming van RCA tijdens de productie niet op theoretische gronden uitgesloten kan worden, is het mogelijk de aanwezigheid van RCA in het klinische product uit te sluiten door middel van een adequate gevalideerde RCA-test.

Mogelijkheid tot RCA vorming in proefpersonen

Bij toediening van een replicatie-deficiënte AdV-vector aan een persoon bestaat de mogelijkheid dat eenzelfde cel tegelijkertijd geïnfecteerd raakt met de vector en een verwant wildtype adenovirus. Wanneer co-infectie optreedt kunnen door recombinatie de verloren functies in de vector hersteld worden en zou RCA kunnen ontstaan. De kans hierop is afhankelijk van de gebruikte AdV-vector.

Voor tweede generatie AdV-vectoren en HD-vectoren is de kans op vorming van RCA door recombinatie met een wildtype adenovirus verwaarloosbaar klein, omdat in deze vectoren grote delen van het virale genoom ontbreken. Voor eerste generatie AdV-vectoren geldt dat recombinatie kan leiden tot herstel van de E1-regio waardoor een replicatiecompetente vector ontstaat. Indien alleen de E1-regio gedeleteerd is in de vector, zal dit leiden tot een replicatie-competent virus dat vergelijkbare eigenschappen heeft als een wildtype adenovirus. Indien eveneens een deletie in de E3-regio van de vector aanwezig is, zal herstel van de E1-regio resulteren in een geattenuëerd virus. Voor zover bekend zijn adenovirussen met een deletie in de E3-regio nooit aangetroffen onder natuurlijke omstandigheden, waardoor verondersteld wordt dat virussen met deze deletie niet kunnen overleven in het milieu.³ Wanneer door recombinatie herstel van de E3-regio plaatsvindt in een $\Delta E1/\Delta E3$ vector, zal de vector replicatie-deficiënt blijven door afwezigheid van de E1-regio. In theorie is het mogelijk dat na meerdere recombinatie 'events' met een hybride AdV-vector een virus vergelijkbaar aan wildtype adenovirus gevormd wordt.

De COGEM is van oordeel dat de resulterende recombinanten geen hogere pathogeniteit of fitness zullen hebben dan het wildtype virus waarmee de proefpersoon geïnfecteerd is geraakt. Daarnaast dient opgemerkt te worden dat bij bepaalde toedieningsroutes van de replicatie-deficiënte vector de kans op co-infectie verder verkleind kan zijn. Wildtype adenovirussen repliceren hoofdzakelijk in de luchtwegen, hoewel in sommige gevallen ook het maagdarmsstelsel of de urinewegen geïnfecteerd kunnen raken.⁸⁷ Bijvoorbeeld bij intramusculaire toediening van een replicatie-deficiënte AdV-vector is daarom de kans dat eenzelfde cel geïnfecteerd kan raken door wildtype virus en de vector verwaarloosbaar klein.

Wanneer er gebruik is gemaakt van vector-backbones samengesteld uit verschillende adenovirussen, zal er bij RCA-vorming een hybride virus ontstaan. Omdat alle adenovirussen ingedeeld zijn in pathogeniteitsklasse 2, heeft de COGEM geen redenen om aan te nemen dat dit voor hybride adenovirussen anders zou zijn, en is zij van oordeel dat de pathogeniteit van dit hybride RCA vergelijkbaar zal zijn met dat van de uitgangsgenorganismen.

Naast recombinatie zou ook complementatie van AdV-vectoren op kunnen treden, door aanwezigheid van wildtype adenovirussen of andere virussen die gelijktijdig in dezelfde cel aanwezig zijn als de vector. Door (trans)complementatie van eiwitten met een vergelijkbare functie als de adenovirale E1-eiwitten, kan de mogelijkheid tot replicatie van de vector tijdelijk hersteld worden. De COGEM is van oordeel dat complementatie van replicatie-deficiënte AdV-vectoren niet uitgesloten kan worden en tot een verhoogde shedding van de vector zou kunnen leiden, maar dat dit slechts voor een beperkte tijd zal optreden. De AdV-vectordeeltjes die na complementatie uitgescheiden worden, zijn nog steeds replicatie-deficiënt en kunnen niet verder verspreiden.

6.3 Deelconclusies

De COGEM concludeert op grond van bovenstaande overwegingen dat:

- Incidentele waargenomen schadelijke effecten na toediening van AdV-vectoren met name betrekking hebben op de patiënt of proefpersoon zelf. Of deze effecten ook kunnen optreden bij derden is afhankelijk van de mate van verspreiding en blootstelling van derden aan deze vectoren;
- Replicatie-deficiënte AdV-vectoren, waarbij tenminste het E1-gebied verwijderd is, geattenuëerd en biologisch ingeperkt zijn, ongeacht het AdV species of (sero)type waarvan de vector is afgeleid;
- Uitscheiding van AdV-vectoren zeer beperkt tot afwezig is, en dat vanwege hun biologische inperking verdere verspreiding niet mogelijk is;
- Indien een AdV-vector recombineert met wild-type adenovirus, of een AdV-vector gecomplementeerd wordt, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

7. Moleculaire karakterisering van het ggo

Voor de milieurisicobeoordeling is het van belang dat de identiteit van het ggo bevestigd is en dat de beoogde mutaties zijn aangebracht. In 2013 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over de genetische karakterisering van ggo's voor klinische toepassingen.⁸⁸ Voor gebruik van replicatie-deficiënte AdV-vectoren als klinische toepassing is het noodzakelijk dat de identiteit van het

uiteindelijke klinische product is vastgesteld en dat is vastgesteld dat de sequentie van het vectorgenoom overeenkomt met de beoogde sequentie. Eventuele afwijkingen in de sequentie mogen niet van invloed zijn op de uitkomst van de milieurisicobeoordeling.

8. Advies

Op grond van het hierboven staande, concludeert de COGEM dat het mogelijk is een generieke milieurisicobeoordeling op te stellen voor klinische toepassingen met replicatie-deficiënte AdV-vectoren, die zijn afgeleid van adenovirussen van humane oorsprong of afkomstig uit niet-humane primaten en waarbij tenminste het E1-gebied is gedeleteerd. De COGEM is van oordeel dat deze vectoren geattenuëerd en biologisch ingeperkt zijn en daardoor niet in staat zijn zich in het milieu te verspreiden. De COGEM is van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij klinische studies met replicatie-deficiënte AdV-vectoren verwaarloosbaar klein zijn, mits aan een aantal randvoorwaarden wordt voldaan. Zij adviseert bij deze studies de volgende randvoorwaarden in acht te nemen:

- De identiteit van het uiteindelijke klinische product is vastgesteld en er is vastgesteld dat de sequentie van het vectorgenoom overeenkomt met de beoogde sequentie. Eventuele afwijkingen in de sequentie mogen niet van invloed zijn op de uitkomst van de milieurisicobeoordeling;
- Het gebruikte transgen codeert niet voor een genproduct dat bijdraagt aan herstel van de geattenuëerde eigenschappen of de replicatie-deficiënte eigenschap van de vector complementeert;
- Het uiteindelijke klinische product bevat geen RCA. Indien de vorming van RCA tijdens de productie van een AdV-vector niet uitgesloten kan worden vanwege sequentie-overlap tussen de AdV-vector en de gebruikte productieceldlijn, dient de aanwezigheid van RCA in de klinische batch uitgesloten te worden door gebruik te maken van een gevalideerde RCA-test.

Referenties

1. The Journal of Gene Medicine. Vectors used in gene therapy clinical trials. <https://a873679.fmphost.com/fmi/webd/GTCT> (bezoekt: 8 maart 2021)
2. Lee CS *et al.* (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes Dis.* 4:43-63
3. COGEM (2018). Generiek advies inschaling replicatie-deficiënte adenovirale vectorsystemen. COGEM advies CGM/180316-01
4. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2019 Release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 8 maart 2021)
5. Human Adenovirus Workgroup. <http://hadvwg.gmu.edu/> (bezoekt: 8 maart 2021)
6. Berk AJ (2013). Chapter 55 *Adenoviridae*. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
7. Harrach B *et al.* (2012). Family *Adenoviridae*. In: Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam

8. Greber UF (2019). Adenovirus entry: From infection to immunity. *Annu. Rev. Virol.* 6: 177-197
9. Wold WSM & Ison MG (2013). Chapter 56 Adenoviruses. In: *Fields virology*, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM et al., Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
10. Bergmans JEN *et al.* (2017). Omlaagschaling van werkzaamheden met replicatie-defectieve AAV- en adenovirale vectoren. COGEM rapport CGM 2017-4
11. Pfitzner S *et al.* (2020). Fluorescent protein tagging of adenoviral proteins pV and pIX reveals ‘late virion accumulation compartment’. *PLoS Pathog.* 16: e1008588
12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). About adenoviruses- transmission. <https://www.cdc.gov/adenovirus/about/transmission.html> (bezocht: 16 maart 2021)
13. Lynch JP & Kajon AE (2016). Adenovirus: Epidemiology, global spread of novel serotypes, and advances in treatment and prevention. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 37: 586-602
14. Lion T. (2014). Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 27: 441-462
15. King CR *et al.* (2016). The persistent mystery of adenovirus persistence. *Trends Microbiol.* 24: 323-324
16. Roy S *et al.* (2012). Adenoviruses in fecal samples from asymptomatic rhesus macaques, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 18:1081-1088
17. Roy S *et al.* (2009). Isolation and characterization of adenoviruses persistently shed from the gastrointestinal tract of non-human primates. *PLoS Pathog.* 5:e1000503
18. Borkenhagen LK *et al.* (2019). Are adenoviruses zoonotic? A systematic review of the evidence. *Emerg. Microbes Infect.* 8: 1679-1687
19. Wold WSM & Toth K (2013). Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 13: 421-433
20. Barouch DH *et al.* (2011). International seroepidemiology of adenovirus serotypes 5, 26, 35, and 48 in pediatric and adult populations. *Vaccine* 29: 5203-5209
21. Morris SJ *et al.* (2016). Simian adenoviruses as vaccine vectors. *Future Virol.* 11: 649-659.
22. Koveshdi I & Hedley SJ (2010). Adenoviral producer cells. *Viruses* 2: 1681-1703.
23. Ricobaraza A *et al.* (2020). High-capacity adenoviral vectors: Expanding the scope of gene therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 3643. doi:10.3390/ijms21103643
24. Parks RJ & Graham FL (1997). A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging. *J. Virol.* 71: 3293-3298
25. Bett AJ *et al.* (1993). Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J. Virol.* 67: 5911-5921
26. Alba R *et al.* (2005). Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther.* 12: S18-S27
27. Schiedner G *et al.* (1998). Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved *in vivo* gene expression and decreased toxicity. *Nat. Genet.* 18: 180-183
28. Zhou HS *et al.* (2002). Production of helper-dependent adenovirus vector relies on helper virus structure and complementing. *J. Gene Med.* 4: 498-509
29. Parks RJ *et al.* (1996). A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93: 13565-13570

30. Gonzalez-Aparicio M *et al.* (2011). Self-inactivating helper virus for the production of high-capacity adenoviral vectors. *Gene Ther.* 18: 1025–1033
31. Palmer D & Ng P (2003). Improved system for helper-dependent adenoviral vector production. *Molec. Ther.* 8: 846-852
32. Havenga M *et al.* (2006). Novel replication-incompetent adenoviral B-group vectors: high vector stability and yield in PER.C6 cells. *J. Gen. Virol.* 87: 2135-2143
33. Abbink P *et al.* (2007). Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *J. Virol.* 81: 4654-4663
34. Parker A *et al.* (2013). Pseudotyping the adenovirus serotype 5 capsid with both the fibre and penton of serotype 35 enhances vascular smooth muscle cell transduction. *Gene Ther.* 20: 1158-1164
35. Barry MA *et al.* (2020). Retargeting adenoviruses for therapeutic applications and vaccines. *FEBS Letters* 594: 1918-1946
36. Bradley RR *et al.* (2012). Adenovirus serotype 5 neutralizing antibodies target both hexon and fiber following vaccination and natural infection. *J. Virol.* 86: 625-629
37. Dmitriev I *et al.* (1998) An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J. Virol.* 72: 9706-9713
38. Reetz J *et al.* (2014). Peptide-based technologies to alter adenoviral vector tropism: ways and means for systemic treatment of cancer. *Viruses* 6: 1540-1563.
39. COGEM (2019). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/190905-02
40. COGEM (2002). Development of an angiogenic gene therapy product for coronary artery disease. COGEM advies CGM/020823-07
41. COGEM (2003). Gene-directed enzyme prodrug therapy. COGEM advise CGM/030804-01
42. COGEM (2006). Toediening van een adenovirale vector coderend voor interleukine-12 aan patiënten met prostaatumoren. COGEM advies CGM/060512-01
43. COGEM (2019). Advies klinische studie met gg-adenovirale vector (rAd-INF) bij patiënten met kwaadaardige pleurale mesothelioom. COGEM advies CGM/191017-03
44. European Medicines Agency (EMA). Zabdeno.
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zabdeno#authorisation-details-section> (bezocht: 13 maart 2021)
45. COGEM (2019). Application for the market authorisation of Ad26.ZEBOV a recombinant, replication-deficient Ebola vaccine. COGEM advies CGM/191212-02 [VERTROUWELIJK]
46. COGEM (2020). Klinische studie met een adenovirale vector (Ad26COVS1) ter preventie van COVID-19. COGEM advies CGM/200710-02
47. COGEM (2021). Application for the market authorisation of AZD1222, a replication-deficient adenovirus vector-based vaccine against COVID-19. COGEM advise CGM/210108-02 [VERTROUWELIJK]
48. COGEM (2021). Application for the market authorisation of Ad26.COV2.S, a replication-deficient adenovirus vector-based vaccine against COVID-19 COGEM Advies CGM/210115-01 [VERTROUWELIJK]

49. Fallaux FJ *et al.* (1999). Who is afraid of replication-competent adenoviruses? *Gene Ther.* 6: 709-712
50. Fallaux FJ *et al.* (1998). New helper cells and matched early region-1 deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* 9: 1909–1917
51. Gao GP *et al.* (2000). A cell line for high-yield production of E1-deleted adenovirus vectors without the emergence of replication-competent virus. *Hum. Gene Ther.* 11: 213-219
52. Schiedner G *et al.* (2000). Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Hum. Gene Ther.* 11: 2105-2116
53. Murakami P *et al.* (2002). A single short stretch of homology between adenoviral vector and packaging cell line can give rise to cytopathic effect-inducing, helper-dependent E1-positive particles. *Hum. Gene Ther.* 13: 909-20
54. Young LS *et al.* (2006). Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J. Pathol.* 208: 299-318
55. Zhu FC *et al.* (2017). Safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine in healthy adults in Sierra Leone: a single-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* 389: 621-628
56. Baden LR *et al.* (2013). First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env vaccine (IPCAVD 001). *J. Infect. Dis.* 207: 240-247
57. Anywaine Z *et al.* (2019). Safety and Immunogenicity of a 2-Dose Heterologous Vaccination Regimen With Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola Vaccines: 12-Month Data From a Phase 1 Randomized Clinical Trial in Uganda and Tanzania. *J. Infect. Dis.* 220: 46-56
58. Raper SE *et al.* (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* 80: 148-158
59. Wilson JM (2009). Lessons learned from the gene therapy trial for ornithine transcarbamylase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 96: 151-157
60. Duerr A *et al.* (2012). Extended follow-up confirms early vaccine-enhanced risk of HIV acquisition and demonstrates waning effect over time among participants in a randomized trial of recombinant adenovirus HIV vaccine (Step Study). *J. Infect. Dis.* 206: 258-266
61. Moodie Z *et al.* (2015). Continued follow-up of phambili phase 2b randomized HIV-1 vaccine trial participants supports increased HIV-1 acquisition among vaccinated men. *PLoS One* 10: e0137666
62. Buchbinder SP *et al.* (2020). Use of adenovirus type-5 vectored vaccines: a cautionary tale. *Lancet* 396:e68-e69
63. Perreau M *et al.* (2008). Activation of a dendritic cell-T cell axis by Ad5 immune complexes creates an improved environment for replication of HIV in T cells. *J. Exp. Med.* 205: 2717–2725
64. Auclair S *et al.* (2018). Distinct susceptibility of HIV vaccine vector-induced CD4 T cells to HIV infection. *PLoS Pathog.* 14: e1006888
65. Nederlandse Omroep Stichting (NOS). Nederland stopt uit voorzorg twee weken met inenten met AstraZeneca vaccin. <https://nos.nl/artikel/2372669-nederland-stopt-uit-voorzorg-twee-weken-met-inenten-met-astrazeneca-vaccin.html> (bezoekt 16 maart 2021).
66. College ter Beoordeling van Geneesmiddelen (CGB). Advies over waarschuwing in de productinformatie AstraZeneca. <https://www.cbg-meb.nl/actueel/nieuws/2021/03/18/advies-over-waarschuwing-in-de-productinformatie-astrazeneca> (bezoekt: 24 maart 2021)

67. European Medicines Agency. COVID-19 Vaccine AstraZeneca: benefits still outweigh the risks despite possible link to rare blood clots with low blood platelets. <https://www.ema.europa.eu/en/news/covid-19-vaccine-astrazeneca-benefits-still-outweigh-risks-despite-possible-link-rare-blood-clots> (bezocht 24 maart 2021)
68. Rijksoverheid. Vaccinaties met AstraZeneca snel hervat. <https://www.rijksoverheid.nl/actueel/nieuws/2021/03/18/vaccinaties-met-astrazeneca-snel-hervat> (bezocht 22 maart 2021)
69. European Medicines Agency (EMA, 2007). Guideline on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors. EMEA/273974/2005
70. Desfarges S & Ciuffi A (2012). Viral Integration and Consequences on Host Gene Expression. *Viruses: Essential Agents of Life* 147-175
71. Wold WSM & Ison MG (2013). Chapter 56 – Adenoviruses. Infection of experimental animals. In: *Fields Virology*, Eds: Knipe DM & Howley PM. P.1734-1735
72. Doerfler W (2009). Epigenetic mechanisms in human adenovirus type 12 oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 19: 136-143
73. Hohlweg U *et al.* (2003). Intraperitoneal dissemination of Ad12-induced undifferentiated neuroectodermal hamster tumors: de novo methylation and transcription patterns of integrated viral and of cellular genes. *Virus Res.* 98: 45-56
74. Mitani K & Kubo S (2002). Adenovirus as an integrating vector. *Curr. Gene Ther.* 2: 135-144
75. Harui A *et al.* (1999). Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors. *J. Virol.* 73: 6141-6146
76. Ye X *et al.* (1998). Evaluating the potential of germ line transmission after intravenous administration of recombinant adenovirus in the C3H mouse. *Hum. Gene Ther.* 9: 2135-2142
77. Hall SJ *et al.* (2000). Direct exposure of mouse spermatogenic cells to high doses of adenovirus gene therapy vector does not result in germ cell transduction. *Hum. Gene Ther.* 11: 1705-1712
78. Schenk-Braat EAM *et al.* (2007). An inventory of shedding data from clinical genetherapy trials. *J. Gene Med.* 9: 910-921
79. Bellon G *et al.* (1997). Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial. *Hum. Gene Ther.* 8: 15-25
80. Tursz T *et al.* (1996). Phase I study of a recombinant adenovirus-mediated gene transfer in lung cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 88: 1857-1863
81. Griscelli F *et al.* (2003). Recombinant adenovirus shedding after intratumoral gene transfer in lung cancer patients. *Gene Ther.* 10: 386-395
82. Keefer MC *et al.* (2012). A phase I double blind, placebo-controlled, randomized study of a multigenic HIV-1 adenovirus subtype 35 vector vaccine in healthy uninfected adults. *PLoS One* 7: 341936
83. Baden LR *et al.* (2013). First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env vaccine (IPCAVD 001). *J. Infect. Dis.* 207: 240-247 (supplementary data)
84. Baden LR *et al.* (2016). Assessment of the Safety and Immunogenicity of 2 Novel Vaccine Platforms for HIV-1 Prevention: A Randomized Trial. *Ann. Intern Med.* 164: 313-322 (supplementary data)
85. Matyas L *et al.* (2005). Arteriogenic gene therapy in patients with unreconstructable

- critical limb ischemia: a randomized, placebo-controlled clinical trial of adenovirus 5-delivered fibroblast growth factor-4. *Hum. Gene Ther.* 16: 1202-1211
86. Harvey BG *et al.* (2002). Safety of Local Delivery of Low- and Intermediate-Dose Adenovirus Gene Transfer Vectors to Individuals with a Spectrum of Morbid Conditions. *Hum. Gene Ther.* 13: 15-63
 87. Lynch JP & Kajon AE (2016). Adenovirus: Epidemiology, global spread of novel serotypes, and advances in treatment and prevention. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 37: 586–602
 88. COGEM (2013). Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing. COGEM advies CGM/130227-05