

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw S.A.M. Dijkma  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 19 juli 2016  
**KENMERK** CGM/160719-02  
**ONDERWERP** Advies: Klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met reuma (LUMC)

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 16-002 met de titel 'A phase I dose escalation study evaluating the safety of ART-I02, a recombinant adeno-associated virus (rAAV) serotype 2/5 gene transfer vector encoding human Interferon- $\beta$  (hIFN- $\beta$ ) under control of a nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) responsive promoter, in patients with rheumatoid arthritis' van het Leids Universitair Medisch Centrum, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een fase I klinische studie in patiënten met reuma. In deze studie wordt een replicatiedeficiënt, genetisch gemodificeerde *Adeno-associated virus* (gg-AAV) vector in een door reuma aangedaan gewricht van de patiënten gebracht. Deze zogenaamde ART-I02 vector infecteert het gewrichtslijmvlies, dat zich in het gewricht bevindt en brengt hier het ontstekingsremmende eiwit, Interferon- $\beta$  tot expressie.

De vector is gebaseerd op een laag pathogeen oudervirus en mist de genen die nodig zijn voor replicatie. Bovendien is voor replicatie van AAV ook de aanwezigheid van een helpervirus nodig. Hierdoor kan het gg-AAV wel cellen infecteren, maar zich hierin niet vermenigvuldigen. Om de minimale kans op replicatie en verspreiding van de vector nog verder te beperken, adviseert de COGEM de patiënten met een actieve virale infectie uit te sluiten van deelname aan de studie. De patiënten mogen 4 uur na de behandeling weer naar huis. De COGEM kan niet uitsluiten dat de vector vanuit de patiënt in het milieu uitgescheiden wordt. Aangezien de vector niet kan repliceren, acht de COGEM de kans dat het gg-AAV zich na blootstelling van derden verder kan verspreiden verwaarloosbaar klein. Om een eventuele kiembaantransmissie ten gevolge van uitscheiding te voorkomen, adviseert zij een aanvullend voorschrift te hanteren. Tevens adviseert de COGEM om behandelde patiënten uit te sluiten van donatie van bloed, cellen en weefsels.

Op basis van bovenstaande gegevens en onder navolging van genoemde voorschriften is de COGEM van mening dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met ART-I02 verwaarloosbaar klein zijn.

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

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap  
Voorzitter COGEM

c.c.           Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo  
                  Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

# Klinische studie met genetisch gemodificeerd *Adeno-associated virus* ter behandeling van patiënten met reumatoïde artritis

## COGEM advies CGM/160719-02

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een fase I klinische studie in patiënten met reumatoïde artritis (RA). Deze ziekte etaleert zich als een chronische ontsteking in gewrichten en resulteert in permanente schade aan kraakbeen en bot in de aangedane gewrichten van de patiënt. In deze studie wordt een replicatiedeficiënt, genetisch gemodificeerde *Adeno-associated virus* (gg-AAV) vector in de gewrichten van de patiënten geïnjecteerd. Hierdoor wordt Interferon- $\beta$  in het gewricht tot expressie gebracht, hetgeen naar verwachting de ontsteking zal onderdrukken. De studie heeft tot doel om de veiligheid en werkzaamheid van een enkele dosis van de gg-AAV vector bij patiënten met RA te testen.

De werkzaamheden voor deze studie worden ten dele in het Centre for Human Drug Research (CHDR) te Leiden en ten dele in het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC) uitgevoerd. Elk van deze rechtspersonen heeft voor zijn deel van deze studie een aparte vergunningaanvraag ingediend. De COGEM is door Bureau GGO voor ieder van deze aanvragen om advies gevraagd. Het onderhavige advies betreft de aanvraag van het LUMC.

#### 1.1 Reumatoïde artritis

Reumatoïde artritis (RA) is een auto-immuunziekte en wordt gekarakteriseerd door een chronische ontsteking van het synoviale membraan (gewrichtslijmvlies).<sup>1</sup> Dit membraan bevindt zich aan de binnenkant van het kapsel dat ieder gewricht omgeeft. Normaal produceert het synoviaal membraan synoviaal vocht dat als smeermiddel dient om het gewricht soepel te laten bewegen. Bij aanvang van RA raakt het synoviale membraan ontstoken en wordt dikker.<sup>2,3</sup> Hierdoor is het bewegen van betreffende gewrichten pijnlijk. In de meeste gevallen zijn de klachten langdurig van aard, maar deze kunnen ook afgewisseld worden met perioden waarin de klachten afwezig zijn. Naarmate het ziekteproces vordert leidt RA geleidelijk tot permanente schade aan kraakbeen en bot met verlies van functionaliteit van het gewricht of zelfs invaliditeit aan toe. Wat de exacte oorzaak is voor het ontstaan van RA is momenteel nog onduidelijk.

RA kan in verschillende gewrichten optreden. In de meeste gevallen betreft het de kleine gewrichten van handen en voeten, maar ook polsen, enkels, knieën en schouders kunnen door RA worden getroffen. Ongeveer 0,5%-1% van de bevolking krijgt in zijn leven te maken met RA.<sup>4</sup> Vrouwen worden 3-5 keer zo vaak getroffen door RA als mannen.<sup>5</sup> In principe kan de ziekte zich op elke leeftijd openbaren, maar meestal gebeurt dit tussen het 35<sup>e</sup> en 50<sup>e</sup> levensjaar.

#### 1.2 Interferon- $\beta$

Interferon- $\beta$  is van nature aanwezig in de mens. Het wordt onder fysiologische condities door de meeste humane cellen in kleine hoeveelheden uitgescheiden.<sup>6,7</sup> Het eiwit is een cytokine met anti-inflammatoire eigenschappen door onder andere de downregulatie van de pro-inflammatoire

cytokines IL-1 $\beta$  en ‘Tumour necrosis factor- $\alpha$ ’ (TNF- $\alpha$ ). In het kader van de behandeling van RA zijn niet alleen de anti-inflammatoire eigenschappen van IFN- $\beta$  van belang, maar ook de anti-angiogenese eigenschappen en de rol van IFN- $\beta$  in bot-homeostase.

### **1.3 Adeno-associated virus**

*Adeno-associated virus* (AAV) behoort tot de familie *Parvoviridae* en het genus *Dependovirus*.<sup>8</sup> Het is een enkelstrengs DNA virus met een genoom van circa 4,7 kb. Het genoom codeert voor twee genen, *rep* en *cap*. Het *rep* gen codeert voor de replicase eiwitten (Rep) die een rol spelen bij de virusreproductie, de expressie van de structurele eiwitten en de integratie van het virusgenoom in het genoom van de gastheer. Het *cap* gen codeert voor de capsid eiwitten (Cap), deze structurele eiwitten vormen de virusmantel. De *rep* en *cap* genen worden geflankeerd door twee ‘*inverted terminal repeats*’ (ITR’s), die betrokken zijn bij DNA-replicatie en integratie van het DNA in een chromosoom van de gastheer. Voor succesvolle replicatie van AAV is co-infectie met een helpervirus nodig, zoals een adenovirus of een herpesvirus.<sup>8,9,10</sup> Als er geen ander virus in de cel aanwezig is, blijft AAV latent in de celkern aanwezig, in afwachting van infectie door een helpervirus.

AAV kan verschillende warmbloedige dieren, inclusief de mens, infecteren.<sup>9</sup> Er zijn verschillende species van AAV (AAV-1 - 9) bekend die onder andere verschillen vertonen in gastheerspecificiteit en weefsel tropisme.<sup>9,11</sup> Infecties met AAV komen wereldwijd en frequent voor (80% van de humane populatie is seropositief voor AAV-2), maar gaan voor zover bekend niet gepaard met ziekteverschijnselen.<sup>12</sup> Overdracht van het virus vindt waarschijnlijk plaats via de respiratoire of gastro-intestinale route.<sup>8</sup>

### **1.4 ART-I02**

Het ggo genaamd ART-I02 is afgeleid van een humaan *Adeno-associated virus* subtype 2 vector (AAV-2). Voor de constructie van de vector zijn de genen die coderen voor de Rep eiwitten en de Cap eiwitten vervangen door een expressiecassette voor het humane Interferon- $\beta$  (hIFN- $\beta$ ). Door deze uitwisseling zijn de ITRs de enige AAV-2 sequenties die nog in de vector aanwezig zijn en is de vector replicatiedeficiënt. De expressie van het hIFN- $\beta$  staat onder transscriptiecontrole van een synthetische NF- $\kappa$ B (nucleaire factor kappa B) responsieve promotor. De promotor bestaat uit een streng van zes opeenvolgende NF- $\kappa$ B bindende motieven en een minimale humane CMV promotor. Voor terminatie van transcriptie en het toevoegen van een polyA streng aan het hIFN- $\beta$  mRNA bevat de expressiecassette het humane groeihormoon polyadenyleringssignaal. Tussen bovengenoemde elementen liggen korte sequenties van 7 tot maximaal 39 nucleotiden. Dit zijn overblijfselen van het cloneringsproces van de vector.

Voor productie van ART-I02 wordt gebruik gemaakt van twee plasmiden. Het ene plasmide, pART-I02, bevat het genoom van het beoogde gg-AAV virusdeeltje en het andere plasmide, pDP5-Kan3, levert in *trans* de AAV5 *cap* en AAV2 *rep* genen. Hierdoor wordt de vector omhuld met de mantel-eiwitten van het humane AAV subtype 5 en ontstaat een AAV2/5 gepseudotypeerd virusdeeltje. De keuze voor het AAV5 capsid is ingegeven door het feit dat dit type AAV de

beoogde cellen in het synoviaal membraan, de humane fibroblast-achtige synoviocyten, het meeste efficiënt infecteert. Naast de AAV5 *cap* genen en AAV2 *rep* genen codeert het tweede plasmide ook voor enkele helpervirus eiwitten. Het betreft de E2A, E4 en VA eiwitten van het Human adenovirus 5. Al deze genen zijn essentieel voor productie van de beoogde gg-AAV vector, maar worden niet ingepakt in het ART-I02 deeltje.

De virale vector wordt geproduceerd door Halix BV door transfectie van HEK293T/17 cellen met genoemde plasmiden. De productie valt niet onder deze vergunningaanvraag.

## 2. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft verschillende keren geadviseerd over de mogelijke risico's voor mens en milieu van een klinische studie met een adeno-associated virale vector. In 2005 betrof het een studie met een gg-AAV vector die codeert voor het lipoproteïne lipase (LPL) eiwit ter behandeling van patiënten met een LPL deficiëntie. In deze patiënten is de afbraak van vetten in het bloed verstoord, met o.a. een verhoogd risico op alveesklierontsteking tot gevolg.<sup>13</sup> In 2013 betrof het een studie met een gg-AAV vector die codeert voor het zogenoemde '*sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase*' (SERCA2a) eiwit ter behandeling van patiënten met hartfalen.<sup>14</sup> Tot slot heeft de COGEM in 2015 geadviseerd over een fase I/II klinische studie met gg-AAV waarin een expressiecassette voor hFIX was gezet. Deze gg-AAV vector werd onderzocht ten behoeve van de behandeling van patiënten met matig ernstige tot ernstige hemofilie B.<sup>15</sup>

In alle drie studies achtte de COGEM de kans op uitscheiding van de AAV vector aanwezig. Om de eventuele nadelige effecten van uitscheiding te minimaliseren, adviseerde de COGEM enkele aanvullende voorschriften te hanteren.

Deze voorschriften waren:

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

Dit laatste voorschrift werd overigens niet geadviseerd bij de studie met hemofiliepatiënten, aangezien deze patiënten reeds zijn uitgesloten van donatie van bloed, cellen en weefsels.

Onder navolging van bovengenoemde voorschriften en op basis van het apathogene en replicatie-deficiënte karakter van de gebruikte AAV-vectoren, achtte de COGEM de risico's van uitscheiding verwaarloosbaar klein. Op basis van haar milieurisicobeoordeling heeft de COGEM over alle drie genoemde klinische studies positief geadviseerd.

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

#### **3.1 Opzet van de studie**

In deze klinische studie krijgen maximaal 50 patiënten eenmalig een dosis ART-I02 intra-articulair toegediend. Deze dosis ligt in de reeks van minimaal  $1 \times 10^{11}$  *vector genomes* (vg) tot maximaal  $5 \times 10^{13}$  vg per patiënt. Na toediening van ART-I02 in het gewricht verblijft de patiënt gedurende 4 uur ter observatie in een speciale patiëntenkamer. Als er tijdens deze observatieperiode geen bijwerkingen worden geconstateerd kan de patiënt naar huis.

In deze studie zal op de dag van injectie, en in week 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 en 24 na injectie urine-, speeksel-, feces-, bloed-, en sperma-monsters worden genomen om de eventuele aanwezigheid van vector DNA te kunnen bepalen. De patiënten worden bemonsterd totdat drie opeenvolgende monsters van elk monstertype negatief testen voor vector DNA. Daarnaast wordt 12 weken na de toediening van ART-I02 door middel van arthroscopie ook een biopsie genomen van weefsel in het gewricht.

Bij de selectie van patiënten voor deze studie worden de volgende inclusie en exclusie criteria gehanteerd.

- Patiënten met verschijnselen van een actieve infectie, inclusief een actieve virale infectie worden uitgesloten van deelname aan de studie;
- Totdat de resultaten van een niet-klinische studie met betrekking tot mogelijke kiembaantransmissie van ART-I02 bekend zijn, is deelname aan de studie beperkt tot vrouwen die geen kinderen (meer) kunnen krijgen;
- Als bovenstaande studie naar de kiembaantransmissie uitwijst dat er geen overdracht plaatsvindt naar het nageslacht, wordt de studie uitgebreid naar mannen en vrouwen die wel vruchtbaar zijn. Deze patiënten dienen een effectieve anticonceptie in combinatie met een barrièremiddel in acht te nemen gedurende de eerste drie maanden na de behandeling of totdat er in drie opeenvolgende sperma-monsters geen vector-DNA aangetoond wordt;
- Tevens worden de behandelde patiënten uitgesloten van donatie van bloed, cellen, weefsels en organen.

#### **3.2 Werkzaamheden die binnen het LUMC uitgevoerd worden**

De werkzaamheden voor deze klinische studie worden ten dele uitgevoerd in het CHDR en ten dele in het LUMC. De apotheek van het LUMC draagt in deze studie zorg voor de opslag en de bereiding van de gewenste dosis van het medische product ART-I02. De bereiding vindt plaats in een veiligheidskabinet klasse II dat zich in een ML-II cleanroom bevindt.

De analyse van de biologische monsters die door het CHDR worden verzameld en opgewerkt, vindt buiten inperking plaats in de diagnostische laboratoria van het LUMC. De aanvrager merkt op dat de meeste analyses geheel geautomatiseerd zijn en worden uitgevoerd in gesloten analyseapparatuur.

Tijdens de studie worden in het LUMC op twee momenten een MRI scan gemaakt van de patiënt. Hierbij worden de standaard hygiëne maatregelen (WIP) voor de medewerker gevolgd.<sup>16</sup> Naast genoemde MRI scan zal in het LUMC ook een arthroscopie worden uitgevoerd, om een biopsie uit het gewricht te nemen. De arthroscopie vindt plaats in een speciale patiëntenkamer en daarbij

worden de WIP richtlijnen: ‘Persoonlijke hygiëne medewerkers’ en ‘Persoonlijke hygiëne patiënt en bezoeker’ gevolgd.<sup>16</sup> Tijdens de arthroscopie zal het personeel tevens wegwerp-laboratoriumjassen en handschoenen dragen. De biopten worden door een externe partij geanalyseerd.

Intern transport van monsters binnen het LUMC zal plaatsvinden conform de richtlijnen in de Regeling ggo 2013.<sup>17</sup> Voor extern transport van het ggo tussen LUMC en CHDR wordt voldaan aan de ADR classificatie UN3373 richtlijnen.<sup>18</sup>

## **4. Overweging**

In de onderhavige aanvraag wordt de replicatiedeficiënte vector ART-I02 toegediend aan patiënten met RA. Mogelijke risico's die hierbij kunnen optreden, hebben betrekking op de pathogeniteit van het ggo, de mogelijke verspreiding van het ggo in het milieu en de eventuele vorming van nieuwe recombinante virussen. Door de verspreiding zouden andere personen dan de deelnemende patiënten geïnfecteerd kunnen worden met het ggo of met een recombinant virus.

### **4.1 Pathogeniteit en karakterisatie van het ggo**

#### **4.1.1 Pathogeniteit**

De in onderhavige studie gebruikte virale vector is gebaseerd op een laag pathogeen oudervirus. De vector bevat de ITRs van het wild-type AAV-2 die nodig zijn voor het inpakken van het genetische materiaal in een virusdeeltje. De *rep* en *cap* sequenties zijn verwijderd en vervangen door het gen dat codeert voor hIFN- $\beta$ . Hierdoor kan het gg-AAV cellen infecteren, maar niet meer repliceren.

De hIFN- $\beta$  sequentie die de vector bevat, is van nature in menselijke cellen aanwezig. Het hIFN- $\beta$  wordt door de meeste cellen geproduceerd in reactie op een virale infectie of de blootstelling aan andere biologische entiteiten of producten. Het hIFN- $\beta$  is betrokken bij antivirale, antiproliferatieve en immuun-modulerende activiteiten. Aangezien de expressie van hIFN- $\beta$  in de vector onder controle staat van een promotor die wordt geactiveerd in aanwezigheid van NF- $\kappa$ B, is de expressie van hIFN- $\beta$  onder normale fysiologische condities beperkt. De expressie van hIFN- $\beta$  neemt pas toe als de concentratie NF- $\kappa$ B stijgt door een ontstekingsreactie.<sup>19</sup>

Op basis van deze gegevens is de COGEM van mening dat de ART-I02 vector apathogeen is.

#### **4.1.2 Moleculaire karakterisering**

De aanvrager heeft de sequentie van het plasmide pART-I02 dat het genoom voor ART-I02 bevat volledig bepaald. In het deel dat de sequentie van het genoom van de AAV vector bevat, zijn twee afwijkingen aangetroffen ten opzichte van de verwachte sequentie. Enerzijds is het een kleine deletie uit een van de ITRs, anderzijds een substitutie van twee nucleotiden in de humane CMV promotor. Beide betreffen een wijziging in een niet-coderende regio.

Ook het genoom van de ART-I02 vector dat geproduceerd is voor de klinische studie is vrijwel volledig in kaart gebracht met behulp van sequentieanalyse. De aanvrager merkt op dat het lastig is om de ITRs aan de uiteinden van het genoom volledig te sequencen. Hierdoor is de sequentie van deze regionen slechts gedeeltelijk bepaald. De sequentie van de tussen de ITRs liggende expressiecassette voor hIFN- $\beta$  is wel volledig in kaart gebracht. De aanvrager stelt dat de

verkregen sequentie van ART-I02 volledig overeen komt met de sequentie van het uitgangsplasmide. Derhalve concludeert hij dat er tijdens de productie van de vector geen wijzigingen zijn geïntroduceerd. De genomsequentie van het plasmide en van ART-I02 zijn zelf niet overlegd.

Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van mening dat ART-I02 voldoende moleculair is gekarakteriseerd. Daarbij acht zij de kans verwaarloosbaar klein dat de geconstateerde wijzigingen een nadelige invloed hebben op de apathogeniteit van het ggo.

#### **4.2 Shedding**

Na toediening van de virale vector mag de patiënt na 4 uur het CHDR verlaten. Hierdoor kan het ggo zowel binnen het CHDR als in de thuissituatie of elders in het milieu worden uitgescheiden. Gebaseerd op preklinische gegevens stelt de aanvrager dat ART-I02 eenzelfde shedding-profiel heeft als andere op AAV gebaseerde vectoren. Hierdoor is de aanvrager van mening dat de kans op shedding van vector DNA in excreties of via bloed het hoogst is in de eerste twee weken na de toediening. Hierna zal de kans op shedding geleidelijk afnemen en deze wordt afhankelijk van de toegediende dosis verwaarloosbaar tussen 8 en 12 weken na toediening. Daarbij wordt opgemerkt dat zelfs als vector DNA in lichaamsvloeistoffen wordt aangetoond, dit niet betekent dat het ook daadwerkelijk infectieus ART-I02 betreft. In een studie van Favre *et al.* naar de aanwezigheid van infectieuze deeltjes in lichaamsvloeistoffen wordt infectieus AAV alleen aangetoond in het plasma en worden de AAV deeltjes binnen 48 tot 72 uur na toediening geklaard.<sup>20</sup>

Op basis van deze gegevens acht de COGEM de kans klein dat er in deze klinische studie infectieus ART-I02 uitgescheiden zal worden door de patiënten. Zij kan evenwel niet geheel uitsluiten dat derden door shedding of door onverhoopte incidenten worden blootgesteld aan het ggo. De kans dat de vector zich na een dergelijke blootstelling van derden verder kan verspreiden, acht de COGEM evenwel verwaarloosbaar klein, omdat het naast een helpervirus ook de *rep* en *cap* sequenties nodig heeft voor replicatie.

Om de potentiële kans op kiembaantransmissie uit te sluiten, stelt de aanvrager in geval van een vruchtbare patiënt als voorwaarde dat effectieve anticonceptie in combinatie met een barrièremiddel gebruikt wordt gedurende de eerste drie maanden na de behandeling of totdat er in drie opeenvolgende sperma-monsters geen vector-DNA aangetoond wordt. De COGEM acht effectieve anticonceptie in combinatie met een barrièremiddel afdoende om kiembaantransmissie te voorkomen. Met betrekking tot het door de aanvrager gesuggereerde alternatief hanteert de COGEM in haar eerdere adviezen echter een minimum van 75 dagen. Dit is gebaseerd op de periode voor een volledige cyclus van de spermatogenese.

#### **4.3 Recombinatie en complementatie**

Het ggo wordt geproduceerd door transfectie van de cellijn HEK293T/17 met twee verschillende plasmiden. Het ene plasmide levert het genoom voor ART-I02 en het andere plasmide codeert voor de AAV-2 Rep eiwitten, voor de AAV-5 Cap eiwitten en voor de helpervirus eiwitten E2A, E4 en VA van het Human adenovirus 5.



#### 4.3.1 Replicatie competent AAV

ART-I02 is een replicatiedefectief virus, die zelfs in aanwezigheid van een helpervirus niet in staat is tot replicatie. De aanvrager acht de kans dat tijdens de productie replicatiecompetent AAV (rcAAV2 of rcAAV5) ontstaat verwaarloosbaar klein, omdat er geen sequentiehomologie is tussen de vectorsequentie op het pART-I02 plasmide en de *rep* en *cap* genen op het pDP5-Kan3 plasmide. In het theoretische geval dat er tijdens de productie toch rcAAV ontstaat, wordt de vectorbatch, voor gebruik, gecontroleerd op de aanwezigheid van rcAAV2 en rcAAV5. In deze test wordt het geproduceerde ART-I02 gekweekt op HeLa cellen in aanwezigheid van het Human adenovirus 5. Onder deze condities zal eventueel gevormd rcAAV vermenigvuldigd worden. Na deze kweekstap wordt een monster van de kweek met een specifieke quantitative PCR (Q-PCR) geanalyseerd op aanwezigheid van de AAV2 *rep* genen en de AAV5 *cap* genen. Deze Q-PCR assay heeft een gevoeligheid van 10 rcAAV per  $4.0 \times 10^{10}$  ART-I02 vectorgenoom kopieën. Voor gebruik dient iedere ART-I02 vectorbatch negatief te testen op zowel rcAAV2 als rcAAV5.

De COGEM acht de kans op aanwezigheid van rcAAV in de vectorbatch verwaarloosbaar klein, omdat er voor de productie van de vector twee verschillende plasmiden worden gebruikt en er voor het ontstaan van rcAAV meerdere recombinaties nodig zijn. Daarbij is de kans op homologe recombinatie minimaal door de afwezigheid van overlappende AAV sequenties tussen beide plasmiden. Bovendien wordt de batch ART-I02 voor gebruik getest op de aanwezigheid van rcAAV2 en rcAAV5 en moet de uitslag van deze testen negatief zijn.

Zelfs in het theoretische geval dat er ondanks deze voorwaarden toch rcAAV partikels in een batch aanwezig zijn, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein vanwege het laag pathogene karakter van de uitgangsvirussen en vanwege het feit dat de vector voor zijn replicatie en verspreiding afhankelijk is van een helpervirus.

#### 4.3.2 Aanwezigheid van niet vector gerelateerde sequenties

De aanvrager geeft aan dat in de klinische vectorbatch naast ART-I02 ook plasmide DNA sequenties aanwezig zijn. Analyse van de aanwezigheid van Kanamycine resistentiegen-sequenties met behulp van Q-PCR heeft uitgewezen dat de concentratie van deze sequenties in de geteste vectorbatch 100 keer lager is dan de concentratie van de ART-I02 vector sequenties. De aanvrager geeft aan dat dit gen wijdverspreid aanwezig is in bodembacteriën in de natuur. Daarbij merkt hij op dat het gen ook aanwezig was in plasmiden die zijn getest in klinische DNA-vaccinatie studies en in plasmiden die gebruikt zijn voor de productie van AAV vectoren voor klinische studies. In geen van deze studies heeft de aanwezigheid van het Kanamycine resistentiegen tot nadelige effecten geleid. Afgezien van de Kanamycine resistentiegen-sequenties sluit de aanvrager niet uit dat de batch ook lage concentraties bevat van de virale sequenties die op het pDP5-Kan 3 plasmide liggen. Dit betreft onder andere enkele adenovirus genen. Aangezien het slechts delen zijn van het adenovirus genoom is de aanvrager van mening dat dit niet tot een infectieus adenovirus kan leiden.

De COGEM merkt op dat het een bekend fenomeen is dat bij de productie van recombinante AAV vectoren een hele lage hoeveelheid niet-virusvector gerelateerde sequenties ingepakt worden in mantelwitte (2 tot 3 log lager dan de betreffende AAV vector).<sup>21</sup> De aanwezigheid van

heterologe sequenties in de vectorbatch leidt volgens de COGEM niet tot risico's voor mens en milieu, omdat deze sequenties geen selectief voordeel opleveren en zich niet verder kunnen verspreiden.

#### 4.3.3 Recombinatie en complementatie in de patiënt

Na toediening van het ggo aan de patiënt kan in aanwezigheid van wild-type AAV en helpervirus recombinatie of complementatie optreden. De aanvrager geeft aan dat een eventuele homologe recombinatie met een wild-type AAV alleen kan plaatsvinden op de homologe ITR sequenties. Deze sequentie is erg kort waardoor de kans op homologe recombinatie zeer laag is.<sup>22</sup> Daarbij resulteert een recombinatie tussen de ITRs van de vector en wild-type AAV in een uitwisseling van de *rep* en *cap* sequenties van het wild-type AAV met de hIFN- $\beta$  expressiecassette van het ggo. In deze situatie ontstaat er geen nieuw recombinant virus, maar zijn de nieuw ontstane virusdeeltjes gelijk aan het ggo of het wild-type AAV. De COGEM acht het risico van een homologe recombinatie met wild-type AAV derhalve verwaarloosbaar klein.

De expressiecassette voor hIFN- $\beta$  bevat een synthetische promotor met daarin NF-kB bindende motieven die afkomstig zijn uit de LTR van het *Human immunodeficiency virus* (HIV). Ook in dit geval wijst de aanvrager op de zeer beperkte lengte van de homologe sequentie (10 nucleotiden) tussen ART-I02 en HIV. Hierdoor acht hij de kans op homologe recombinatie tussen HIV en ART-I02 verwaarloosbaar klein.

Daarnaast bevat de synthetische promotor van ART-I02 ook een minimale versie van de humane CMV promotor. De homologie tussen deze minimale CMV promotor en de oorspronkelijke promotor van het wild type humane CMV omvat 38 nucleotiden.<sup>22</sup> De aanvrager acht dit wederom erg kort voor efficiënte recombinatie. Bovendien acht hij door de intra-artculaire injectie van ART-I02 de kans klein dat ART-I02 en hCMV in dezelfde cel aanwezig zullen zijn. Tot slot wijst de aanvrager op het feit dat de AAV vectoren met een wild-type hCMV promotor, waaronder het tot de markt toegelaten Glybera geen onverwachte milieurisico's aan het licht hebben gebracht.

Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van mening dat de eventuele risico's voor mens en milieu van een homologe recombinatie tussen ART-I02 en hetzij HIV of hCMV verwaarloosbaar klein zijn.

Door complementatie kunnen er in theorie in de patiënt opnieuw ART-I02 deeltjes worden gevormd. Echter, de kans dat er in dezelfde cel in het slijmvlies van het gewricht zowel ART-I02, wild-type AAV en een helpervirus aanwezig zijn, acht de COGEM verwaarloosbaar klein. Dit is onder andere gebaseerd op het feit dat de vector niet wordt toegediend wanneer er aanwijzingen zijn voor een actieve virale infectie. De COGEM acht het risico op complementatie derhalve verwaarloosbaar klein.

## 5. Advies

De COGEM is van mening dat ART-I02 afdoende moleculair is gekarakteriseerd en als apathogeen aangemerkt kan worden. Met het oog op het productiesysteem en de controle van de vectorbatch

acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de vectorbatch rcAAV bevat. Ditzelfde geldt voor de kans op recombinatie of complementatie van ART-I02 in de patiënt onder de door de aanvrager voorgestelde voorwaarde dat patiënten met een actieve (virale) infectie uitgesloten worden van deelname. Zij kan de kans op blootstelling van derden ten gevolge van uitscheiding van het ggo evenwel niet geheel uitsluiten. Om de eventuele nadelige effecten van uitscheiding te minimaliseren acht de COGEM de volgende voorschriften van belang:

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

Onder navolging van deze voorschriften en het eerder genoemde voorschrift betreffende het uitsluiten van patiënten met een actieve virale infectie, is de COGEM van mening dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met ART-I02 verwaarloosbaar klein zijn.

## 6. Referenties

1. Chung IM *et al.* (2016). Rheumatoid arthritis: The stride from research to clinical practice. *Int. J. Mol. Sci.* doi:10.3390/ijms1706900
2. GezondVGZ. (2011). Reumatoïde artritis (reuma). [www.gezondvgz.nl/%7B6CD158D6-D0F1-49DE-A258-3F2FD8BA7BF5%7D](http://www.gezondvgz.nl/%7B6CD158D6-D0F1-49DE-A258-3F2FD8BA7BF5%7D) (bezocht: 11 juli 2016)
3. InfoNu; Mens en Gezondheid (2011). Reuma (RA) oorzaken, symptomen en behandeling <http://mens-en-gezondheid.infonu.nl/aandoeningen/84119-reuma-ra-oorzaken-symptomen-en-behandeling.html> (bezocht: 11 juli 2016)
4. Alamanos Y & Drosos AA. (2005). Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 4: 130-136
5. Areskoug-Josefsson K. & Oberg U (2009). A literature review of the sexual health of women with rheumatoid arthritis. *Musculoskeletal Care* 7: 219-226
6. Holten van J *et al.* (2002). Interferon- $\beta$  for treatment of rheumatoid arthritis? *Arthritis Res.* 4: 346-352
7. Akbar AN *et al.* (2000). IFN-alpha and IFN-beta: a link between immune memory and chronic inflammation. *Immunol. Today* 21: 337-342
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. Muzyczka N & Berns KI (2001). *Parvoviridae: The viruses and their replication*. In: *Fields virology*, volume 2, fourth edition. Edited by Knipe DM en Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
10. Smith-Arica JR & Bartlett JS (2001). Gene therapy: recombinant adeno-associated virus vectors. *Current cardiology reports* 3: 43-49
11. 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

12. Gonçalves MA (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology J.* doi:10.1186/1743-422X-2-43
13. 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
14. COGEM (2013). Een fase 2b klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met hartfalen. COGEM advies CGM/130603-01
15. 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
16. Werkgroep Infectiepreventie (2011). WIP richtlijnen [www.rivm.nl/Onderwerpen/W/Werkgroep\\_Infectie\\_Preventie\\_WIP/WIP\\_Richtlijnen/Ziekenhuizen\\_ZKH](http://www.rivm.nl/Onderwerpen/W/Werkgroep_Infectie_Preventie_WIP/WIP_Richtlijnen/Ziekenhuizen_ZKH) (bezocht: 13 juli 2016)
17. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2014). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <http://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2016-07-01> (bezocht: 13 juli 2016)
18. UN3373 medical packaging (2016). Biological substances transport. [www.un3373.com/transport-biological-substances/p650-road-transport/](http://www.un3373.com/transport-biological-substances/p650-road-transport/) (bezocht: 13 juli 2016)
19. Khoury M *et al.* (2007). Inflammation-inducible anti-TNF gene expression mediated by intra-articular injection of serotype 5 adeno-associated virus reduces arthritis. *J. Gen. Med.* 9: 596-604
20. Favre D *et al.* (2001). Immediate and long-term safety of recombinant Adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. *Mol. Ther.* 4: 559-566
21. 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
22. Rubnitz J and Subramani S (1984). The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2253-2258