

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

DATUM 21 augustus 2017
KENMERK CGM/170821-01
ONDERWERP Advies klinische studie met gg-AAV in patiënten met het Crigler-Najjar syndroom

Geachte mevrouw Dijkma,


Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 17-001 met de titel 'Evaluation of safety and efficacy of an intravenous injection of GNT0003, a suspension of recombinant AAV8 viral vector carrying the human UGT1A1 transgene in patients with Crigler-Najjar syndrome' van het Academisch Medisch Centrum te Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een klinische studie in patiënten met het Crigler-Najjar syndroom. In deze studie wordt een replicatiedeficiënt, genetisch gemodificeerde Adeno-associated virusvector (gg-AAV) in de bloedbaan van patiënten gebracht. Deze zogenaamde GNT0003 vector infecteert de lever en brengt hier het uridine-difosfaat-glucuronosyltransferase isoform 1A1 (UGT1A1) tot expressie, dit zorgt ervoor dat ongeconjugeerd bilirubine naar geconjugeerd billirubine wordt omgezet.

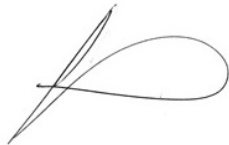
De vector is gebaseerd op een laag pathogeen oudervirus, waarbij alle virale genen zijn verwijderd inclusief de genen die nodig zijn voor replicatie. Bovendien is voor replicatie van AAV ook de aanwezigheid van een helpervirus nodig. Hierdoor kan het gg-AAV wel cellen infecteren, maar zich hierin niet vermenigvuldigen. Om de minimale kans op replicatie en verspreiding van de vector nog verder te beperken, adviseert de COGEM de patiënten met een bekende actieve virale infectie uit te sluiten van deelname aan de studie. De COGEM kan niet uitsluiten dat de vectordeeltjes vanuit de patiënt in het milieu uitgescheiden wordt. Aangezien de vector niet kan repliceren, acht de COGEM de kans dat het gg-AAV zich verder kan verspreiden verwaarloosbaar klein. Om 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 oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met GNT0003 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 het Crigler-Najjar syndroom

COGEM advies CGM/170821-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een klinische studie in patiënten met het Crigler-Najjar syndroom. Patiënten met het Crigler-Najjar syndroom maken geen tot nauwelijks functioneel uridine-difosfaat-glucuronosyltransferase isoform 1A1 (UGT1A1) aan. Hierdoor wordt het giftige ongeconjugeerde bilirubine niet omgezet in onschadelijke bilirubine-glucuronides en kan er onder andere ernstige hersenschade ontstaan. In deze studie wordt een replicatiedeficiënte genetisch gemodificeerde Adeno-associated virusvector (gg-AAV) intraveneus aan de patiënten toegediend. Hierdoor wordt UGT1A1 tot expressie gebracht in de lever wat naar verwachting de ophoping van ongeconjugeerde bilirubine zal voorkomen. Het doel van de klinische studie is om de veiligheid en effectiviteit van een eenmalige dosis van de gg-AAV vector bij patiënten met het Crigler-Najjar syndroom te testen.

1.1 Het Crigler-Najjar syndroom

Het Crigler-Najjar (CN) syndroom is een zeer zeldzame (<1 per 1.000.000 mensen) autosomaal recessieve erfelijke aandoening veroorzaakt door mutaties in het *UGT1A1* gen van het *UGT* locus.^{1,2,5} Dit locus codeert voor negen uridine-difosfaat (UDP)-glucuronosyltransferases (UGTs) welke glucuronidering van verscheidene (potentieel toxische) substraten katalyseren om de excretie in gal en urine te bevorderen.^{3,4} Het *UGT1A1* gen codeert voor de 1A1 isoform van uridine-difosfaat-glucuronosyltransferase (UGT1A1), het enige enzym dat glucuronidering van bilirubine katalyseert.⁵ UGT1A1 komt specifiek tot expressie in de lever en zet het giftige bilirubine om in onschadelijke bilirubine-glucuronides die door de lever uitgescheiden worden in de gal.^{4,5}

Patiënten met het Crigler-Najjar syndroom hebben, afhankelijk van de onderliggende mutatie in het *UGT1A1* gen, een verminderde tot geheel ontbrekende activiteit van het UGT1A1 enzym. Als gevolg hiervan treedt er accumulatie op van ongeconjugeerd bilirubine (UCB) in alle lichaamsweefsels.⁴ Het Crigler-Najjar syndroom kan onderscheiden worden in type I en II.⁶

Mutaties die leiden tot (vrijwel) complete afwezigheid van UGT1A1 activiteit resulteren in CN syndroom type I, wat wordt gekarakteriseerd door potentieel dodelijke ophoping van bilirubine in het bloed (serum bilirubine niveau 20-50 mg/dl), ook wel hyperbilirubinemia genoemd. De ziekte openbaart zich kort na de geboorte en wanneer deze onbehandeld blijft leidt dit, als gevolg van de neurotoxiciteit van UCB, tot onomkeerbare lethale hersenschade, zogenaamde bilirubine encefalopathie (kernicterus). De behandeling van CN syndroom type I bestaat uit intensieve levenslange lichttherapie (10-12 uur/dag) waarvan de effectiviteit na verloop van tijd afneemt, waardoor patiënten uiteindelijk een levertransplantatie nodig hebben.^{1,3}

Mutaties die leiden tot een ernstig verminderde, maar niet geheel afwezige UGT1A1 activiteit (serum bilirubine niveau meestal < 20 mg/dl) resulteren in CN syndroom type II.^{3,4} Het ziektebeeld manifesteert zich in de eerste dagen na de geboorte in de vorm van ongeconjugeerde hyperbilirubinemia. Type II leidt vrijwel nooit tot kernicterus. Patiënten met CN syndroom type II

hebben een betere prognose dan patiënten met type I en worden behandeld met lichttherapie en fenobarbital.^{3,5}

1.2 Adeno-associated dependoparvovirus A

Adeno-associated dependoparvovirus A (AAV) (voorheen Adeno-associated virus) behoort tot de familie *Parvoviridae* en het genus *Dependoparvovirus*.⁷ Het is een enkelstrengs DNA virus met een genoom van circa 4,7 kb. Het genoom codeert twee genen, *rep* en *cap*. Het *rep* gen codeert 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 mantel-eiwitten (Cap), deze structurele eiwitten vormen de virusmantel. De *rep* en *cap* genen worden geflankeerd door twee 'inverted terminal repeats' (ITR's), die noodzakelijk zijn voor DNA-replicatie en integratie van het DNA in een chromosoom van de gastheer. Voor efficiënte replicatie van AAV is co-infectie met een helpervirus nodig, zoals een adenovirus of een herpesvirus.^{8,9,10} 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.⁸ Er zijn verschillende serotypes van AAV (AAV-1 - 13) bekend die onder andere verschillen vertonen in gastheerspecificiteit en weefsel-tropisme.^{8,11} 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.¹² Overdracht van het virus vindt waarschijnlijk plaats via de respiratoire of gastro-intestinale route.⁸

1.4 GNT0003

In deze klinische studie wordt gebruik gemaakt van een genetisch gemodificeerd organisme (ggo), GNT0003, gebaseerd op een humaan Adeno-associated virus serotype 2 (AAV-2) vector. Voor de constructie van de vector zijn de genen die coderen voor de Rep en Cap eiwitten vervangen door een expressiecassette voor het humane UGT1A1 (hUGT1A1) eiwit. Door deze uitwisseling zijn de ITR's de enige AAV-2 sequenties die nog in de vector aanwezig zijn en is de vector replicatiedeficiënt. In de vector staat de expressie van hUGT1A1 onder transcriptionele controle van een hybride promotor, hApoE-hAAT. De hApoE-hAAT enhancer/promotor sequentie bestaat uit de 'hepatic control region' van het humane apolipoproteïne E (hApoE) locus en de humane alpha-1 antitrypsine (hAAT) leverspecifieke promotor.¹³ Hierdoor komt het transgen *hUGT1A1* specifiek tot expressie in de lever. Het transgen UGT1A1 is codon-geoptimaliseerd om een verhoogde eiwitexpressie te bewerkstelligen en om het aantal mogelijke alternatieve open leesramen te verminderen. Verder bevat het ggo het intron van het humaan *globine subunit beta-2* (*HBB2*) gen wat een verhoogde RNA stabiliteit bewerkstelligt. De *HBB2* intronsequentie is op 3 nucleotideposities gewijzigd ten opzichte van de wild-type sequentie om mogelijke alternatieve translationele start codons te verwijderen. Verder bevat de expressiecassette het polyadenyleringssignaal van het *HBB2* gen. Tussen de bovengenoemde elementen liggen zes korte sequenties. Dit zijn overblijfselen als gevolg van het kloneringsproces van de vector en bevatten geen coderende sequenties.

1.5 Productie van de gg-AAV vector

Voor de productie van GNT0003 wordt gebruik gemaakt van drie plasmiden. Het 'transgen plasmide' bevat het genoom van het beoogde gg-AAV. Het Ad5 helper plasmide (pAd5) codeert voor de helpervirus eiwitten E2A, E4 en 'viral associated' (VA) van het Human adenovirus serotype 5 (HAdV-5). Verder wordt gebruik gemaakt van een AAV helper plasmide Rep2/Cap8, welke *in trans* de AAV-8 *cap* en AAV-2 *rep* genen aanlevert. Hierdoor wordt de vector omhuld met het manteleiwit van AAV serotype 8 en ontstaat een AAV2/8 gepseudotypeerd virusdeeltje. De keuze voor het AAV-8 capsid is ingegeven door het feit dat dit serotype een sterk levertropisme heeft.^{14,15,16} De virale vector GNT0003 wordt geproduceerd door het bedrijf Genethon door de genoemde plasmiden te co-transfecteren in HEK293 cellen. De HEK293 cellen brengen de *E1A* en *E1B* genen van HAdV-5 constitutief tot expressie, wat eveneens nodig is voor de productie van gg-AAV vector. De productie maakt geen deel uit van de onderhavige vergunningaanvraag.

2. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft verschillende keren geadviseerd over de mogelijke risico's voor mens en milieu van klinische studies met AAV vectoren. 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 alvleesklierontsteking tot gevolg.¹⁷ 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.¹⁸ Verder heeft de COGEM in 2015 geadviseerd over een fase I/II klinische studie met gg-AAV waarin een expressiecassette voor de humane factor IX (hFIX) was gezet. Deze gg-AAV vector werd onderzocht ten behoeve van de behandeling van patiënten met matig ernstige tot ernstige hemofilie B.¹⁹ Tot slot heeft de COGEM in 2016 geadviseerd over een fase I klinische studie met een gg-AAV vector die codeert voor het humane Interferon- β (hIFN- β) ter behandeling van patiënten met reumatoïde artritis (RA).²⁰

In alle vier 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:

- 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 studies met hemofilie- en RA patiënten, 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 vier genoemde klinische studies positief geadviseerd.

3. Informatie over de klinische studie

3.1 Opzet van de studie

De klinische studie met GNT0003 zal plaatsvinden op meerdere locaties in Europa waaronder in het Academisch Medisch Centrum (AMC) te Amsterdam. In deze studie krijgen maximaal 50 patiënten eenmalig een dosis GNT0003 van maximaal 2×10^{13} vectorgenomen per kilogram (vg/kg). De vector wordt intraveneus toegediend met behulp van een programmeerbare infusiepomp. Vorming van aërosolen en morsen zullen zoveel mogelijk worden voorkomen.

De infuuszak met het ggo wordt in de ziekenhuisapotheek in een veiligheidskabinet van klasse II voorbereid. Tijdens de preparatie van het ggo dragen de medewerkers beschermende kleding en handschoenen. De infuuszak wordt in een gesloten, lekdichte container naar de afdeling gastro-enterologie en hepatologie vervoerd waar het ggo zal worden toegediend. Tijdens de toediening van het ggo draagt het medisch personeel beschermende kleding, een veiligheidsbril, handschoenen en een mond- en neusmasker. Toediening vindt plaats in een eenpersoonskamer met beperkte toegang tijdens de toediening. De aanvrager zal op verschillende tijdstippen voor en na injectie urine-, speeksel-, feces- bloed-, en sperma-monsters afnemen bij de patiënten om de eventuele aanwezigheid van vector DNA te kunnen bepalen. De patiënten worden bemonsterd totdat twee opeenvolgende monsters negatief testen voor vector DNA. Daarnaast worden er mogelijk bipten genomen van organen, waaronder de lever. Afname, opslag en bewerking van deze monsters zullen plaatsvinden conform standaard geldende procedures in het ziekenhuis voor mogelijk infectieus patiëntenmateriaal.

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

- Patiënten die seksueel actief zijn dienen effectieve contraceptie in de vorm van een fysiek barrièremiddel in acht te nemen gedurende de eerste zes maanden na behandeling;
- Vrouwen die zwanger zijn worden niet geïnccludeerd in de studie;
- Patiënten met een acute ziekte, waaronder klinisch actieve (virale) infecties in de vier weken voorafgaand aan de geplande behandeling, worden uitgesloten van de studie;
- Patiënten die behandeld zijn met het ggo worden uitgesloten van donatie van bloed, organen, weefsels en cellen voor transplantatie.

4. Overweging

In de onderhavige aanvraag wordt de replicatiedeficiënte vector GNT0003 toegediend aan patiënten met het Crigler-Najjar syndroom. Mogelijke risico's die hierbij kunnen optreden, hebben betrekking op de pathogeniteit van het ggo, de mogelijke verspreiding van het ggo in het milieu en

de eventuele vorming van nieuwe recombinante virussen. Door verspreiding zouden andere personen dan de deelnemende patiënten geïnfecteerd kunnen worden met het ggo of met een recombinant virus.

4.1 Pathogeniteit en karakterisatie van het ggo

4.1.1 Pathogeniteit

De in onderhavige studie gebruikte virale vector is gebaseerd op een laag pathogeen oudervirus. Het tropisme van de vector is, vanwege het AAV-8 manteleiwit hetzelfde als het wild-type AAV-8. Het wild-type virus kan alleen repliceren in de aanwezigheid van een helpervirus. Infectie met AAV is niet geassocieerd met ziekte bij de mens.

De vector bevat de ITR's 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 hUGT1A1. Hierdoor kan het gg-AAV niet meer repliceren in geïnfecteerde cellen.

Het eiwit waarvoor de *hUGT1A1* sequentie in de vector codeert, is van nature in menselijke cellen aanwezig. Het hUGT1A1 enzym wordt geproduceerd in de lever en zet ongeconjugerd bilirubine om naar geconjugerd bilirubine dat door de lever uitgescheiden wordt in de gal. Aangezien de expressie van hUGT1A1 in de vector onder controle staat van de leverspecifieke hApoE-hAAT enhancer/promotor sequentie is de expressie van hUGT1A1 beperkt tot de lever.

Op basis van deze gegevens is de COGEM van oordeel dat de GNT0003 vector apathogeen is.

4.1.2 Moleculaire karakterisering

De aanvrager heeft alle drie de plasmiden die gebruikt zijn voor de productie van GNT0003 gekarakteriseerd door middel van enzymatische analyse (digestieprofiel) en sequencing. De aanvrager stelt dat de plasmidesequenties volledig overeen komen met de verwachte sequentie. Ook het genoom van de virale vector GNT0003 is volledig gesequenced en komt volgens de aanvrager volledig overeen met de sequentie van het uitgangsplasmide. Verder is de correcte expressie van het transgen bevestigd met Western blot-analyse. Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van oordeel dat de moleculaire karakterisering van GNT0003 volledig is.

4.2 Shedding

Behandelde patiënten worden niet in isolatie gehouden en mogen het ziekenhuis verlaten. Hierdoor kan het ggo zowel in het ziekenhuis als in de thuissituatie of elders in het milieu worden uitgescheiden door shedding via urine, speeksel, bloed en sperma. Een pre-klinische biodistributiestudie met GNT0003 in ratten en verscheidene (pre-)klinische studies met andere vergelijkbare AAV vectoren^{16,21,22,23,24} laten zien dat shedding van AAV vectordeeltjes gedurende meerdere weken na behandeling plaatsvindt. Dit is echter een tijdelijk fenomeen omdat de virusvectoren replicatiedeficiënt zijn. Data van een langlopende klinische vervolgstudie uit 2014, waarin een AAV8 vector (AAV8-FIX) eenmalig intraveneus werd toegediend aan patiënten met hemofilie, laat zien dat er zes weken na toediening geen vector meer werd uitgescheiden.¹⁶ De

toegediende dosis AAV8-FIX (maximaal 2×10^{12} vectorgenoomkopieën per kg) komt overeen met de voorgestelde toe te dienen startdosis GNT0003 in de onderhavige aanvraag. Mede op basis van bovenstaande gegevens stelt de aanvrager dat de kans op shedding van vector DNA in excreties en via bloed het hoogst zal zijn in de eerste weken na de toediening en dat, afhankelijk van de dosis, de kans op shedding geleidelijk zal afnemen. De aanvrager verwacht dat GNT0003 binnen twee maanden na toediening volledig geklaard zal zijn uit bloed en andere excreten. 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.²⁵ Zelfs als er vector DNA in lichaamsvloeistoffen wordt aangetoond, betekent dit niet dat het ook daadwerkelijk infectieus GNT0003 betreft. Daarnaast wordt het risico op infectieuze gg-AAV verder verkleind zodra de patiënt neutraliserende antilichamen heeft ontwikkeld tegen AAV-8.¹⁶ De kans dat de vector na infectie van een cel zich verder zal verspreiden, acht de COGEM verwaarloosbaar klein, omdat naast een helpervirus ook de *rep* en *cap* sequenties nodig zijn voor replicatie.

AAV vector DNA kan enkele weken tot maanden aangetoond worden in sperma. Dit is echter een tijdelijk fenomeen en de vector wordt voornamelijk aangetoond in de vloeistof en niet in de motiele fractie.²⁶ De aanvrager acht kiembaantransmissie onwaarschijnlijk mede gezien het feit dat AAV vectoren niet efficiënt integreren in het genoom maar voornamelijk episomaal aanwezig zijn, en hierdoor niet persisteren in actief replicerende cellen, daarnaast is AAV kiembaantransmissie niet beschreven in de literatuur.^{21,27,28,29,30} Om de potentiële kans op kiembaantransmissie verder te verkleinen, stelt de aanvrager als voorwaarde dat patiënten die seksueel actief zijn effectieve anticonceptie in de vorm van een fysiek barrièremiddel in acht dienen te nemen gedurende de eerste zes maanden na de behandeling. Gezien de eerder voorgestelde aanvullende voorschriften,^{17,18,19,20} kan de COGEM voor de onderhavige klinische studie instemmen met het voorstel van de aanvrager.

4.3 Recombinatie en complementatie

Het ggo wordt geproduceerd door co-transfectie van de cellijn HEK293 met drie verschillende plasmiden. Het 'transgen plasmide' levert het genoom voor GNT0003. Het pAd5 plasmide codeert voor de helpervirus eiwitten E2A, E4 en VA van HAdV-5 en het AAV helper plasmide codeert voor de AAV-2 Rep en AAV-8 Cap eiwitten.

4.3.1 Replicatiecompetent AAV

GNT0003 is een replicatiedefectieve virale vector, welke zelfs in aanwezigheid van een helpervirus niet in staat is tot replicatie.

De aanvrager acht de kans dat er tijdens de productie replicatiecompetent AAV (rcAAV) ontstaat verwaarloosbaar klein, omdat er geen sequentiehomologie is tussen de van AAV en HAdV-5 afkomstige sequenties op de gebruikte plasmiden. Ook is de kans op het ontstaan van rcAAV gereduceerd door gebruik te maken van drie verschillende plasmiden. Aangezien de maximale capaciteit van AAV capside ongeveer 5 kilobase is, acht de aanvrager de kans dat een complete coderende regio wordt ingepakt zeer klein. Theoretisch gezien zou niet-homologe

recombinatie tussen het Rep2/Cap8 AAV helper plasmide en vectorsequenties kunnen leiden tot rcAAV, maar deze zou nog steeds afhankelijk zijn van een helpervirus om te kunnen repliceren.³¹

De vectorbatch wordt voor gebruik gecontroleerd op de aanwezigheid van rcAAV, om de theoretische mogelijkheid van rcAAV uit te sluiten. In deze test worden zoogdiercellen vermeerderd in de aanwezigheid van GNT0003 en een helper adenovirus. Onder deze condities zal eventueel gevormd rcAAV vermenigvuldigd worden. Na drie replicatieronden wordt een kweekmonster met een specifieke quantitative PCR (qPCR) geanalyseerd op aanwezigheid van AAV-2 *rep* en AAV-8 *cap* DNA. Deze qPCR assay heeft een gevoeligheid van 10 rcAAV per 1.0×10^{10} GNT0003 vectorgenoomkopieën. Een batch wordt geaccepteerd indien er minder dan 100 rcAAV gedetecteerd zijn per 1×10^8 vectorgenoomkopieën.

De COGEM acht de kans op aanwezigheid van rcAAV in de vectorbatch verwaarloosbaar klein, omdat er voor de productie van de vector drie 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 de plasmiden. Bovendien wordt de GNT0003 batch voor gebruik getest op de aanwezigheid van rcAAV.

4.3.2 Aanwezigheid van niet-vector gerelateerde sequenties

De aanvrager geeft aan dat in de klinische vectorbatch naast GNT0003 ook lage hoeveelheden plasmide DNA sequenties aanwezig zijn (ratio plasmide kopieën/vg <5%). Volgens de aanvrager kunnen dit onder andere stukjes adenovirussequentie afkomstig van het Ad5 helper plasmide, AAV-2 *rep* en AAV-8 *cap* sequenties afkomstig van het helper plasmide Rep2/Cap8, en kanamycineresistentiegen-sequenties zijn. De aanvrager merkt op dat het kanamycineresistentiegen veel gebruikt wordt in plasmiden voor klinische DNA-vaccinatie studies en in plasmiden die gebruikt zijn voor de productie van AAV vectoren. In geen van deze studies heeft de aanwezigheid van het kanamycineresistentiegen tot nadelige effecten geleid. De aanvrager sluit niet uit dat de batch ook lage concentraties bevat van de virale sequenties die op het pAd5 plasmide liggen. Dit betreft onder andere enkele adenovirusgenen. Aangezien het slechts delen zijn van het adenovirus genoom is de aanvrager van mening dat dit niet tot een infectieus adenovirus kan leiden. Verder stelt de aanvrager dat, in het geval dat AAV2 *rep* en AAV8 *cap* sequenties afkomstig van het helper plasmide Rep2/Cap8, in virusdeeltjes worden gepakt, dit replicatiedeficiënte virusdeeltjes zullen zijn, aangezien de batch getest wordt op de afwezigheid van replicatiecompetente virusdeeltjes.

De COGEM merkt op dat het een bekend fenomeen is dat bij de productie van recombinante AAV vectoren een lage hoeveelheid niet-virusvector gerelateerde sequenties ingepakt worden in manteleiwitten (2 tot 3 log lager dan de betreffende AAV vector).³² 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. Bij recombinatie tussen de ITR's van de vector en wild-type AAV kunnen de *rep* en *cap* sequenties van het wild-type AAV uitgewisseld worden met de *hUGT1A1* expressiecassette van het ggo. In deze situatie ontstaat er geen nieuw recombinant virus, maar zijn de nieuw ontstane virussen 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.

Door complementatie kunnen er in theorie in de patiënt opnieuw GNT0003 deeltjes worden gevormd. Echter, de kans dat er in dezelfde cel in de lever zowel GNT0003, 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. Indien er toch complementatie optreedt en er een recombinant AAV virusdeeltje gevormd wordt dan zal deze nog steeds replicatiedeficiënt zijn. De COGEM acht het risico ten gevolge van complementatie derhalve verwaarloosbaar klein.

5. Advies

De COGEM is van oordeel dat GNT0003 afdoende moleculair is gekarakteriseerd en als apathogeen aangemerkt kan worden. Gezien 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 GNT0003 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 toegediende ggo echter niet geheel uitsluiten. De COGEM acht het van belang dat de behandelde patiënten worden uitgesloten van donatie van bloed, cellen en weefsels. Om de potentiële kans op kiembaantransmissie uit te sluiten, stemt de COGEM in met het voorstel van de aanvrager dat patiënten die seksueel actief zijn effectieve anticonceptie in de vorm van een fysiek barrièremiddel in acht dienen te nemen gedurende de eerste zes maanden na de behandeling. Onder navolging van deze voorschriften en het eerder genoemde voorschrift betreffende het uitsluiten van patiënten met een actieve virale infectie, is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met GNT0003 verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Crigler JF & Najjar VA (1952). Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus. *Pediatrics* 10: 169-180
2. Ronzitti G *et al.* (2016). A translationally optimized AAV-UGT1A1 vector drives safe and long-lasting correction of Crigler-Najjar syndrome. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 20;3:16049. eCollection 2016.
3. Memon N *et al.* (2016). Inherited disorders of bilirubin clearance. *Pediatr. Res.* 79: 378-386
4. Sugatani J (2013). Function, genetic polymorphism, and transcriptional regulation of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* 28: 83-92

5. Bosma PJ *et al.* (1994). Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J. Biol. Chem.* 269: 17960-17964
6. Arias IM *et al.* (1969). Chronic nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with glucuronyl transferase deficiency. Clinical, biochemical, pharmacologic and genetic evidence for heterogeneity. *Am. J. Med.* 47: 395-409
7. International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 19 juli 2017)
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. Miao CH *et al.* (2000). Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression *in vivo* but not *in vitro*. *Mol. Ther.* 1: 522-532
14. Nathwani AC *et al.* (2007). Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates. *Blood.* 109: 1414-1421
15. Nathwani AC *et al.* (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 365: 2357-2365
16. Nathwani AC *et al.* (2014). Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 371: 1994-2004
17. COGEM (2005). Getherapie van lipoproteïne lipase (LPL) deficiënte patiënten met een adeno-associated virale vector coderend voor het LPL-eiwit (AMT-010). COGEM advies CGM/050530-01
18. COGEM (2013). Een fase 2b klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met hartfalen. COGEM advies CGM/130603-01
19. 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
20. COGEM (2016). Klinische studie met genetisch gemodificeerd *Adeno-associated virus* ter behandeling van patiënten met reumatoïde artritis (LUMC). COGEM advies CGM/160719-02
21. Natwani AC *et al.* (2011). Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins. *Mol. Ther.* 19: 876-885

22. Wang G *et al.* (2014). Assessment of toxicity and biodistribution of recombinant AAV8 vector-mediated immunomodulatory gene therapy in mice with Pompe disease. *Mol. Ther. Methods Clin Dev.* 1:14018 doi: 10.1038/mtm.2014.18. eCollection 2014.
23. Favaro P *et al.* (2009). Host and vector-dependent effects on the risk of germline transmission of AAV vectors. *Mol. Ther.* 17: 1022-1030
24. Chen SJ *et al.* (2013). Biodistribution of AAV8 vectors expressing human low-density lipoprotein receptor in a mouse model of homozygous familial hypercholesterolemia. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 24: 154-160
25. 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
26. Schuettrumpf J *et al.* (2006). Inadvertent germline transmission of AAV2 vector: findings in a rabbit model correlate with those in a human clinical trial. *Mol. Ther.* 13: 1064-1073
27. Ehrhardt A *et al.* (2003). Episomal Persistence of Recombinant Adenoviral Vector Genomes during the Cell Cycle *In Vivo*. *J. Virol.* 77: 7689-7695
28. Chen ZY *et al.* (2001). Linear DNAs concatemerize *in vivo* and result in sustained transgene expression in mouse liver. *Mol. Ther.* 3: 403-410
29. Bortolussi G *et al.* (2014). Life-long correction of hyperbilirubinemia with a neonatal liver-specific AAV-mediated gene transfer in a lethal mouse model of Crigler-Najjar Syndrome. *Hum. Gene Ther.* 25: 844-855
30. Pañeda A *et al.* (2009). Effect of adeno-associated virus serotype and genomic structure on liver transduction and biodistribution in mice of both genders. *Hum. Gene Ther.* 20: 908-917
31. Wright JF (2009). Transient transfection methods for clinical adeno-associated viral vector production. *Hum. Gene Ther.* 20: 698-706
32. Hauck B *et al.* (2009). Undetectable transcription of cap in a clinical AAV vector: implications for performed capsid in immune responses. *Mol. Ther.* 17: 144-152