

Advies betreffende: **Gene modified tumor cell vaccine against malignant melanoma**

Kennisgever: **Academisch Ziekenhuis Leiden**

COGEM kenmerk  
**CGM/010702-02**

BGGO nummer  
**BGGO 01/07**

Datum advies  
**2 juli 2001**

## **Het experiment**

### *Het doel*

Doel van de behandeling is om de immuunrespons van de patiënt tegen zijn eigen melanoomcellen te stimuleren door middel van vaccinatie met autologe melanoomcellen, die door ex vivo genetische modificatie de humane genen coderend voor het cytokine GM-CSF en het co-stimulerende eiwit B7.2 tot expressie brengen. Bij de modificatie wordt gebruik gemaakt van een op Adeno Associated Virus (AAV) gebaseerde vector.

### *Karakteristieken van het vectorsysteem*

De vector bevat de Inverted Terminal Repeats (ITRs) van AAV, die dienen als in cis werkend packaging signaal en als origin of replication. Doordat de vector geen andere AAV sequenties bevat, kunnen replicatie en packaging alleen plaatsvinden als de daarvoor benodigde AAV functies door complementatie beschikbaar zijn.

De vector is, net als AAV, in staat om genetisch materiaal over te dragen naar een breed gastheerbereik aan humane cellen; daarbij bestaat een voorkeur voor epitheelcellen.

### *Karakteristieken van het productie systeem*

Productie van de vector vindt plaats in HeLa cellen die worden getransduceerd met een plasmide dat een AAV genoom bevat zonder de ITRs. Vervolgens worden deze cellen getransduceerd met een tweede plasmide dat de vector bevat. De vector bestaat uit de gewenste expressiecassettes geflankeerd door ITRs. Vervolgens worden de cellen geïnfecteerd met adenovirus.

Vectorpreparaten bevatten naast recombinant AAV (rAAV) ook AAV dat, in tegenstelling tot rAAV, in staat is in aanwezigheid van een helpervirus te repliceren ('replicatie-competent' AAV, rcAAV) gevormd door niet-homologe recombinatie.

Op basis van de gegevens van de aanvrager kan worden geschat dat een preparaat  $10^{-4}$  rcAAV per rAAV partikel bevat. In een 'worst case' scenario gaan de aanvragers uit van een frequentie van  $10^{-3}$  rcAAV per rAAV. De kwaliteitscriteria van de aanvrager worden hierop afgestemd, de aanvragers geven aan een titer toe te staan van rcAAV die maximaal 0,033 is van de titer van rAAV transducerende deeltjes.

De aanvragers geven aan dat alternatieve productiesystemen in ontwikkeling zijn, waarbij de vorming rcAAV sterk wordt gereduceerd. Echter, dergelijke systemen bevinden zich nog in een ontwikkelingsfase en zijn daarom niet binnen afzienbare tijd geschikt voor grootschalige productie. In de huidige aanvraag is het gebruik van de betreffende productiemethoden onmogelijk.

De aanvrager heeft aan de hand van een beschouwing conclusies getrokken over de hoeveelheid in het vaccin aanwezige rcAAV. Deze conclusies zijn gebaseerd op de aanname dat een rcAAV partikel, als het eenmaal een cel heeft geïnfecteerd, niet meer hoeft te worden beschouwd als rcAAV. Het vaccin bevat dan een factor 8000 minder rcAAV dan het vectorpreparaat. De COGEM spreekt er zich niet over uit of deze redenering valide is of niet, maar gaat er bij haar risico-analyse van uit dat zowel rAAV als rcAAV aanwezig zijn en dat na toediening van het vaccin replicatie van rAAV op kan treden.

AAV is een helpervirus-afhankelijk virus dat voor replicatie afhankelijk is van een co-infectie van de gastheercel door een adeno- of herpesvirus.

In afwezigheid van adenovirus of Herpes Simplex Virus (HSV) zal het rcAAV slechts stabiel in het genoom van de gastheer integreren en vervolgens latent aanwezig blijven. Bij een acute adenovirus- of HSV infectie zou rcAAV zich kunnen vermenigvuldigen. Dit is echter afhankelijk van het feit of de rcAAV bevattende doelwitcel geïnfecteerd kan worden door het adenovirus of HSV. Vermenigvuldiging van de vector (rAAV) kan volgens de aanvrager alleen plaatsvinden als alle componenten: adenovirus (of HSV), rcAAV en rAAV, in één cel aanwezig zijn.

Opgemerkt dient te worden dat AAV ook in afwezigheid van adenovirus of HSV, kan repliceren. De aanvrager geeft aan dat autonome replicatie van AAV alleen is waargenomen onder zeer speciale condities, met name onder omstandigheden van 'genotoxic stress'.

Onder deze omstandigheden is aangetoond dat de replicatie van AAV een factor 2 tot 6 lager is dan de replicatie van AAV in aanwezigheid van een helpervirus. Concluderend moet gesteld worden dat de vorming van replicatie competent AAV ook in afwezigheid van adenovirus en HSV niet uitgesloten kan worden.

#### *Karakteristieken van het vaccin*

Het vaccin wordt geproduceerd op basis van autologe melanoomcellen waarvan de genetische modificatie in vitro wordt uitgevoerd. Voorafgaand aan de transductie worden de cellen blootgesteld aan een hoge dosis gammastraling (110 Gy). In een eerdere aanvraag (BGGO 00/03) zijn gegevens aangeleverd waaruit blijkt dat deze dosis gammastraling de dosis die nodig is om melanoomcellen hun proliferatieve vermogen te doen verliezen met vele orden van grootte overtreft. Een verlies van dit proliferatieve vermogen is nodig om een snelle vermenigvuldiging van melanoomcellen in de patiënt te voorkomen. De behandeling leidt bovendien tot verhoogde DNA synthese, wat de efficiency van de expressie van de vector verhoogt.

De verwachting is dat de vector na transductie voor het overgrote deel episomaal in de cel aanwezig zal blijven. Integratie in het genoom kan echter niet worden uitgesloten.

Aangezien de melanoomcellen na de bestraling niet in staat zijn tot verdere replicatie, is de vraag of integratie plaatsvindt echter niet relevant.

De aanvrager neemt aan dat de gemodificeerde cellen binnen enkele dagen door het immuunsysteem worden verwijderd; dit is echter niet systematisch onderzocht. Bij deze aanname kunnen vraagtekens gezet worden aangezien het hier gaat om autologe cellen die normaliter aan het immuunsysteem kunnen ontsnappen. Deze cellen moeten in principe opgeruimd worden door fagocyterende cellen (bijvoorbeeld macrofagen) van het

aspecifieke afweersysteem van de patiënt; of het immuunsysteem van de patiënten afdoende zal reageren moet nog uit het onderzoek blijken.

De aanvrager suggereert dat bij de patiënt aanwezige antilichamen tegen AAV, en daarmee tegen de vector, in staat zijn om verspreiding van de vector tegen te gaan. Hierover bestaat echter geen zekerheid. De COGEM komt op dit punt tot de conclusie dat er onzekerheid is over het lot van de vector, nadat het vaccin is ingebracht in de patiënt. Door de aanwezigheid van rcAAV samen met rAAV kan niet worden uitgesloten dat er replicatie van de vector optreedt. De screening van patiënten voor afwezigheid van een acute infectie met Adenovirus of Herpes simplex virus geeft weliswaar enige zekerheid dat die replicatie beperkt zal blijven. Er is echter onvoldoende empirische onderbouwing om conclusies te kunnen trekken over de gevolgen van replicatie voor eventuele verspreiding van rAAV buiten de patiënt.

#### *Karakteristieken van het insert*

Het insert bevat de genen coderend voor humaan GM-CSF en B7.2. Deze genen komen in melanoomcellen over het algemeen niet tot expressie. Zowel GM-CSF als B7.2 staan onder controle van een CMV promotor, waardoor beiden constitutief tot expressie komen. Expressie van het insert in een cel stimuleert een immuunreactie tegen cellen van hetzelfde type. Op dit gegeven is het werkingsmechanisme van het vaccin gebaseerd. Indien de vector in niet-doelcellen internaliseert, dan zou dit theoretisch een auto-immuunreactie tegen deze niet-doelcellen als bijwerking tot gevolg kunnen hebben.

#### *Kwaliteitscriteria voor de productie van de vector*

De productie van de vector geschiedt onder GMP, bij Aventis Pharma Deutschland (Marburg, Duitsland) in samenwerking met MediGene (Martinsried/München Duitsland). De kwaliteitscriteria voor de vectorbatches worden beschreven in de aanvraag. Voor milieuveiligheid relevante criteria zijn:

- vrij van een aantal virussen, waaronder HIV 1, HIV 2, HTLV 1, HTLV 2;
- vrij van AdV en HPV DNA;
- de titer rcAAV (inf. centers): max. 0,033 van de titer rAAV transducerende deeltjes.

#### *Plaats en omstandigheden van productie van het vaccin*

Transductie van de melanomacellen geschiedt onder GMP, bij Génopoiétic (Beynost, Frankrijk)

Kwaliteitscriteria voor vaccinbatches worden in de aanvraag beschreven

#### *Het Study Protocol*

De studie zal 24 patiënten omvatten. De aanvrager geeft de in- en exclusiecriteria voor patiënten. De volgende in- en exclusiecriteria zijn van belang uit oogpunt van milieuveiligheid:

##### Inclusie:

- Women of childbearing potential with a negative pregnancy test;
- Patient (both men and women) using effective contraception until at least 4 weeks after the last vaccination;

##### Exclusie:

- HBsAG, HCV or HIV infection or other immune deficiencies not allowed;

- Verder leiden de volgende omstandigheden tot een 'delay of the consecutive vaccination' (de duur van het uitstel, of criteria voor het beëindigen van het uitstel worden niet gegeven):
  - Patients with recent adenoviral infection as determined by serology and/or throat swab culture;
  - Patients with recent herpes simplex type 1 or 2 infection as determined by serology and/or careful clinical inspection.

#### *Verspreiding van de vector buiten de patiënt*

Uitgangspunt van de studie is de verwachting dat infectie van een cel met de vector leidt tot expressie van GM-CSF en B7.2 in die cellen; dit leidt tot stimulering van een immuunrespons tegen deze cellen. Als de vector zich verspreidt in het lichaam van de patiënt kan in principe ieder celtype van de patiënt geïnfecteerd worden. Er kan vervolgens een auto-immuunreactie tegen dat celtype optreden. Dit kan ook gebeuren in het lichaam van personen in de omgeving van de patiënt die worden blootgesteld aan vectordeeltjes, die uit de patiënt vrijkomen ('shedding' van de vector).

De gegevens over het lot van de vector na toediening van het vaccin zijn tegenstrijdig. De aanvrager heeft gegevens afkomstig van een tweetal studies geleverd. In immunosuppressieve CD-1 naakte muizen is een biodistributie studie uitgevoerd waarbij met vector getransduceerde cellen werden ingespoten in de muizen. Het betreffende vectorpreparaat was "gespiked" met een gespecificeerde hoeveelheid rcAAV; en een niet gespecificeerde hoeveelheid rAAV. Met behulp van PCR technieken werd alleen rAAV DNA teruggevonden in de milt. Volgens de aanvrager zou het transport van DNA vanuit getransduceerde cellen door antigeen-presenterende cellen hiervoor een verklaring zijn. De aanvrager concludeert dat op basis van deze studie geen hazards geïdentificeerd kunnen worden. In de studie wordt niet gekeken naar shedding; de aanvrager presenteert de gegevens ook niet als een studie naar shedding. De studie is naar mening van de COGEM op een aantal punten onduidelijk, o.m. op het punt van de in de transductie toegepaste dosis rAAV.

Daarnaast stuurt de aanvrager een artikel mee van Kay et al.<sup>1</sup>, waarin gegevens worden verstrekt over shedding bij patiënten die een hoge dosis rAAV intramusculair krijgen toegediend. In dat geval is er gedurende de eerste 24 uur shedding van rAAV in speeksel en urine aantoonbaar.

De COGEM concludeert dat op basis van met name het laatste artikel, shedding van AAV en rAAV niet uitgesloten kan worden. Het toegediende preparaat in de studie van Kay et al.<sup>1</sup> bestaat weliswaar uit een geconcentreerd viruspreparaat is en geen autoloog cellulair vaccin. De gegevens kunnen echter worden geïnterpreteerd als onderbouwing dat transport en shedding van de vector voor kunnen komen, wanneer in het lichaam van de patiënt rAAV of rcAAV in enige hoeveelheid voorkomt.

De aanvragers geven aan een PCR test uit te zullen voeren waarbij gecontroleerd wordt op in serum aanwezig rcAAV. Indien dergelijke tests negatief zijn acht de COGEM het waarschijnlijk dat shedding niet optreedt.

Daarnaast adviseert de COGEM de aanwezigheid van antilichamen tegen AAV als inclusie criterium te hanteren, omdat van deze antilichamen mogelijk een beschermende werking uit kan gaan tegen shedding.

---

<sup>1</sup> Kay et al. Nature Genetics, 24 (2000), 257-267

## **Advies**

De COGEM kan instemmen met de uitvoering van het gentherapie experiment onder de condities beschreven in de aanvraag, indien daarbij wordt voldaan aan de volgende aanvullende voorwaarden.

Aan de inclusiecriteria moet worden toegevoegd dat bij de patiënt antilichamen tegen AAV moeten kunnen worden aangetoond.

Bij de eerste drie patiënten moet na iedere toediening van het vaccin worden nagegaan dat er gedurende de eerste 48 uur na toediening geen rAAV kan worden aangetoond.

Voor het aantonen moet gebruik worden gemaakt van een voldoende gevoelige PCR reactie die specifiek rAAV aantoonst. De patiënten moeten in het ziekenhuis blijven, en afzonderlijk worden verpleegd, totdat bekend is dat bij deze monitoring geen rAAV werd aangetoond. Mocht bij deze monitoring wel rAAV worden aangetoond, dan dienen de patiënten in ieder geval gehospitaliseerd te blijven totdat de conclusies van nader overleg tussen aanvrager, vergunningverlener en de COGEM bekend zijn.