

Advies betreffende: **Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy**

Kennisgever: **Academisch Ziekenhuis Leiden**

COGEM kenmerk
CGM/030804-01

BGGO nummer
BGGO 03/01

Datum advies
8 augustus 2003

Inleiding

Mensen met artrose (slijtage) van de heup kunnen veel pijn hebben die niet altijd met pijnstillers te behandelen is. Als uiteindelijke behandeling wordt vaak een kunstheup in het gewricht geplaatst. In Nederland worden jaarlijks ongeveer 20.000 heupprothesen geplaatst. Van alle heupprothesen laat 7-13% los binnen tien jaar. Patiënten met een losgelaten heupprothese worden over het algemeen behandeld door middel van revisiechirurgie. Dit houdt in dat de oude prothese wordt verwijderd, de ruimte eronder wordt schoongemaakt en een nieuwe prothese wordt geplaatst. Sommige patiënten, zoals bijvoorbeeld hartpatiënten, kunnen echter niet geopereerd worden, omdat er een te groot risico is op overlijden tijdens of vlak na de operatie.

In de studie wordt gebruik gemaakt van een door genetische modificatie verkregen adenovirusstam, CTL102, waarin een bacterieel *ntr* gen is gebracht. Dit gen codeert voor het enzym nitroreductase. De rol van nitroreductases is in het algemeen om bescherming te bieden tegen zuurstofradicalen die vrijkomen bij de omzetting van quinonen (moleculen betrokken bij biologische oxydatie-reductie processen). In de onderhavige toepassing wordt het enzym gebruikt voor de omzetting van de inactieve stof CB 1954 in de therapeutisch actieve vorm van de stof, die wordt benut voor de afdoding van weefsel rondom de heupprothese. Een ontsteking van het weefsel tussen de heupprothese en de femurschacht (interfaseweefsel) veroorzaakt het loslaten van de heupprothese. Na infectie met de in de aanvraag beschreven adenovirusstam CTL102 wordt het interfaseweefsel gevoelig voor de geactiveerde cytotoxische prodrug CB 1954. Toediening van CB 1954 leidt tot vernietiging van het interfaseweefsel. De ruimte die hierdoor ontstaat tussen de heupprothese en het bot wordt opgevuld met botcement. Dit zorgt voor stabilisatie van de heupprothese waardoor de pijn afneemt en de patiënt zich beter zal kunnen bewegen. De aanvraag betreft een fase I studie, wat een kleinschalig klinisch onderzoek betekent met als primair doel de toxiciteit van de therapie te onderzoeken.

Eerder COGEM advies

Op 2 mei 2000 heeft de COGEM positief geadviseerd op een aanvraag betreffende het gebruik van dezelfde adenovirale vector CTL 102 in combinatie met toediening van CB 1954. Hierbij handelde het om een andere toepassing gericht op de behandeling van primaire en gemetastaseerde levertumoren (CGM/000502-02). Destijds concludeerde de COGEM, op grond van een analyse van de mogelijke risico's, dat onder voorwaarden

geen bezwaar bestaat tegen de toepassing van deze adenovirale vector CTL 102. Op 26 januari 2001 heeft de COGEM de geldigheid van dit advies bevestigd (CGM/010126-02).

Overwegingen

De vector CTL 102

In de studie wordt gebruik gemaakt van een door genetische modificatie verkregen adenovirus type 5 stam, CTL102. In deze vector zijn het E1a/E1b gebied en het E3 gebied verwijderd waardoor de vector replicatie deficiënt is geworden. In de vector CTL 102 is het E1a/E1b gebied vervangen door het bacteriële *ntr* gen dat onder controle staat van een cytomegalovirus (CMV) promotor. Het *ntr* gen codeert voor het enzym nitroreductase. De rol van nitroreductases is in het algemeen om bescherming te bieden tegen zuurstofradicalen die vrijkomen bij de omzetting van quinonen. De afwezigheid van het E3 gebied maakt cellen waarin het virus zich bevindt, gevoeliger voor de immunologische afweer, waardoor cellen die de virale vector dragen gemakkelijker worden opgeruimd door het immuunsysteem.

Daarnaast bevat het construct een niet-coderend DNA-fragment (enhancer), dat zelf niet tot expressie komt, maar zorgt dat de expressie van het *ntr* gen in humane cellen wordt verhoogd, en een stopsignaal (terminator) voor de transcriptie van het *ntr* gen.

De adenovirale vector wordt geproduceerd in de packaging cellijn Per.C6, omdat de vector zelf niet meer kan repliceren. In deze cellijn is het nagenoeg uitgesloten dat replicatie competent adenovirus (RCA) gevormd wordt. Het ontstaan van RCA in de packaging cellijn treedt op wanneer er overlap is tussen de virale sequenties in de packaging cellijn en het DNA van de vector. Door recombinatie tussen de overlappende delen kunnen de verschillende stukken genetisch materiaal met lage frequentie zodanig aan elkaar gekoppeld worden dat RCA ontstaat. Overlap kan worden voorkomen door zorgvuldige keuze en controle van de virale sequenties die in de packaging cellijn worden gebracht, en van de sequenties die uit de virale vector worden verwijderd. Bij de constructie van de cellijn Per.C6 en van de vector CTL 102 zijn voorzorgsmaatregelen genomen om de genoemde overlap te voorkomen. Het is daarmee vrijwel uitgesloten dat RCA wordt gevormd. Uit praktijkproeven waarin deze packaging cellijn is gebruikt voor de productie van vectoren vergelijkbaar met CTL 102, is voldoende gebleken dat bij de productie geen RCA wordt gevormd.

Het criterium is dat in een batch van 10^{10} actieve vectordeeltjes geen RCA aantoonbaar mag zijn. Bij de uitvoering van de genterapie wordt de vector direct in het heupgewricht toegediend, in oplopende doses, van $3 \cdot 10^9$ tot $1 \cdot 10^{11}$ actieve vectordeeltjes. Daarbij wordt verwacht dat verspreiding van de vector buiten het heupgewricht beperkt is. Bovendien zullen de vectordeeltjes die buiten het heupgewricht geraken snel worden geïnactiveerd door het immuunsysteem.

Effecten van het nitroreductase enzym in combinatie met de prodrug CB 1954

De vector zal voornamelijk interfaseweefsel in de directe nabijheid van het heupgewricht infecteren waarmee hij in contact komt. Een geïnfecteerde cel zal gedurende enkele dagen of weken het nitroreductase enzym synthetiseren. Toxicologische studies met de vector die het nitroreductase enzym tot expressie brengt hebben geen resultaten opgeleverd die wijzen op schadelijke effecten. In de ontwerpbeschikking wordt vermeld

dat transgene proefdieren die het *ntr* tot expressie brengen in hun cellen daar geen waarneembare nadelige gevolgen van ondervinden.

Het interfaseweefsel wordt vervolgens blootgesteld aan de prodrug CB 1954 in een dosering van 24 mg/m². Als gevolg van de aanwezigheid van het nitroreductase enzym wordt de prodrug omgezet in een toxische actieve stof. Het interfaseweefsel waarin deze omzetting heeft plaatsgevonden zal hierdoor afsterven. Humane cellen bevatten een vergelijkbaar enzym dat in staat is om dezelfde omzetting te doen. Dit enzym is echter 30 maal minder actief dan het *ntr* genproduct. Bij een juiste dosering zal daarom de stof CB 1954 alleen in de *ntr* dragende cellen worden omgezet in een hoeveelheid van de toxische vorm van de stof, die leidt tot celdood. Het weglekken van de geactiveerde stof uit de afgedode *ntr* dragende cellen naar cellen in de directe omgeving zal leiden tot afsterven van cellen in de onmiddellijke nabijheid van de *ntr* dragende cellen (bystander effect).

De dosering van de prodrug CB 1954 wordt onvoldoende onderbouwd. Het is daardoor onbekend of de cellen worden gedood en er nog adenovirus aanwezig is. De COGEM zou uit oogpunt van kennisverwerving willen aanbevelen om op dag 9 (wanneer ook de botboringen plaatsvinden) van de procedure ook gewrichtsvocht af te nemen, waarin wordt aangetoond of adenovirus nog aanwezig is. Wanneer het gewrichtsvocht op dag 9 negatief is voor adenovirus, vormt het geen risico voor mens en milieu. Als het gewrichtsvocht of weefsel nog wel adenovirus bevat zal dit waarschijnlijk in enkele weken door het eigen immuunsysteem worden opgeruimd en vormt het ook geen risico voor mens en milieu. In het geval dat de patiënt in deze periode geopereerd zou moeten worden (bijvoorbeeld in geval van een gebroken heup) is er in ieder geval een aanwijzing dat de patiënt mogelijk infectieus kan zijn. Daarnaast is het belangrijk inzicht te hebben of de toegediende dosis prodrug voldoende was.

Voorschriften met betrekking tot het klinisch protocol

In de voorschriften wordt gesteld dat uitsluitend patiënten worden toegelaten die een betrouwbaar regime van contraceptie volgen vanaf de toediening tot ten minste tachtig dagen na het moment waarop na toediening van de vector voor de eerste maal neus- en keelstrijkjes en monsters van bloed, feces en urine van de patiënt zijn genomen, waarvan vervolgens is aangetoond dat zij vrij zijn van de vector CTL 102. Het is de COGEM niet duidelijk waarop deze termijn van tachtig dagen is gebaseerd. Daar de patiënten die worden toegelaten tot het experiment 75 jaar of ouder zijn, is contraceptie voor de risicoanalyse bovendien geen belangrijke overweging.

In de voorschriften wordt gesteld dat tot de studie uitsluitend patiënten worden toegelaten als ze geen acute adenovirusinfectie dragen. De COGEM stelt voor om dit te wijzigen in het uitsluitend toelaten van patiënten wanneer ze geen symptomen hebben die kunnen wijzen op een adenovirale infectie. Tenslotte stelt de COGEM voor om in de voorschriften over het uitsluitend toelaten van patiënten die niet binnen 28 dagen voorafgaand aan het begin van de studie een behandeling hebben ondergaan niet van immuuntherapie te spreken maar van immuunsuppressie, aangezien immuuntherapie een te breed begrip is.

Conclusie en Advies

De COGEM adviseert positief over de uitvoering van het beschreven onderzoek conform eerdere adviezen over vergelijkbare studies. De COGEM acht de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein en kan instemmen met de voorgestelde maatregelen.