

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

Aan de Staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

| | | | |
|---------------|-----------------|---------------|---------------|
| Uw kenmerk | Uw brief van | Kenmerk | Datum |
| BGGO 03/08.12 | 5 februari 2004 | CGM/040309-01 | 10 maart 2004 |

Onderwerp
Advies BGGO 03/08

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de ontwerpbeschikking BGGO 03/08, getiteld 'A Phase I dose escalating trial of MDX-010 in combination with CG1940 and CG8711 in patients with metastatic hormone refractory prostate cancer', van VU Medisch Centrum Amsterdam, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting:

Het doel van de fase I klinische studie is om de veiligheid en effectiviteit van een vaccin voor patiënten met prostaattumoren in combinatie met een immuunstimulerend antilichaam te bestuderen. Het vaccin bestaat uit twee prostaattumorcellijnen die genetisch gemodificeerd zijn met een Adenovirus-geassocieerd virus (rAAV) waarin de sequentie voor de humane granulocyt macrofaag kolonie stimulerende factor (hgGM-CSF) is gekloneerd. Verwacht wordt dat expressie van het hgGM-CSF door de vaccincellen in de patiënt tot gevolg zal hebben dat een immuunrespons wordt opgewekt tegen de prostaattumoren.

De COGEM acht de kans verwaarloosbaar klein dat de genetisch gemodificeerde cellijnen replicatie-competent AAV bevatten waardoor na toediening aan de patiënt uitscheiding van de vector in het milieu zou optreden. Tevens worden de cellen vóór toediening bestraald zodat ze niet meer kunnen vermenigvuldigen in de patiënt. Op basis hiervan is de COGEM van mening dat de risico's van deze klinische studie voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

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

Hoogachtend,

Prof. dr. ir. B.C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

Titel: Klinische fase I studie met AAV-GM-CSF gemodificeerde prostaattumorcellijnen in combinatie met antilichaam MDX-010 in patiënten met prostaatkanker

COGEM advies: CGM/040309-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's voor mens en milieu van een fase I klinische studie waarbij patiënten prostaattumorcellijnen toegediend krijgen die genetisch gemodificeerd zijn met een Adenovirus-geassocieerd virus (rAAV) waarin de sequentie voor de humane granulocyt macrofaag kolonie stimulerende factor (hgGM-CSF) gekloneerd is. Het doel van het onderzoek is om de veiligheid en effectiviteit van het vaccin in combinatie met drie doses MDX-010 antilichaam te bestuderen. Verwacht wordt dat expressie van hgGM-CSF door de vaccincellen tot gevolg zal hebben dat een immuunrespons wordt opgewekt tegen de tumorantigenen die door de vaccincellen tot expressie worden gebracht. Toediening van antilichaam MDX-010 zal mogelijk de immuunrespons versterken.

Prostaatkanker

Per jaar wordt bij 6400 mannen in Nederland prostaatkanker vastgesteld, waarbij meer dan de helft van deze mannen 70 jaar of ouder is (1). Ongeveer 5-10% van alle mannen met prostaatkanker heeft de ziekte gekregen door erfelijke aanleg. De prostaat is een klier die in de onderbuik om de urinebuis heen ligt en die prostaatvocht aanmaakt dat bij de zaadlozing samen met de zaadcellen naar buiten komt. Prostaatkanker ontwikkelt zich in de cellen van de klierbuisjes van de prostaat. Bij prostaatkanker kan de tumor doorgroeien in omliggend weefsel en gaan metastaseren in bijvoorbeeld de botten of in de lever. De vijfjaarsoverleving bij een curatieve behandeling van prostaatkanker door operatie en/of bestraling ligt op 75% (1).

De aanvraag heeft betrekking op een fase I klinisch onderzoek, waarbij patiënten die lijden aan prostaattumoren, intradermaal een vaccin toegediend krijgen. Het vaccin bestaat uit twee prostaattumorcellijnen die genetisch gemodificeerd zijn met een AAV vector waarin de sequentie voor het hgGM-CSF gekloneerd is. Beide cellijnen worden vóór de toediening bestraald zodat de cellen niet meer in het lichaam van de patiënt kunnen vermenigvuldigen. De cellen zijn echter nog wel in staat om een aantal levensfuncties uit te oefenen, zoals de productie en secretie van het hgGM-CSF (2). De aanvrager verwacht dat de cellen na toediening niet langer dan vier dagen aanwezig zullen blijven en hgGM-CSF kunnen produceren. Daarnaast krijgen de patiënten intraveneus drie verschillende doses antilichaam MDX-010 toegediend. Dit

antilichaam gaat een interactie aan met CTL-A4 dat voorkomt op cellen van het immuunsysteem. Aanwezigheid van CTL-A4 leidt tot onderdrukking van het immuunsysteem. Als gevolg van de interactie tussen het antilichaam met deze factor van het immuunsysteem wordt CTL-A4 geïnactiveerd en zal een versterking van het immuunsysteem optreden.

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft reeds eerder geadviseerd (CGM/010206-01) over *ex vivo* genetische modificatie van cellen met AAV met sequenties coderend voor het cytokine GM-CSF (BGGO 00/05). Destijds is de COGEM tot de conclusie gekomen dat de aanvragers gebruik dienen te maken van verbeterde productiesystemen dan wel te voorzien in een monitoringsysteem waarmee shedding bij patiënten waargenomen kan worden. Na het intrekken van de desbetreffende aanvraag is een nieuwe aanvraag (BGGO 01/07) ingediend. De COGEM heeft geadviseerd (CGM/010702-02 en CGM/011129-03) dat een monitoringsprotocol door de aanvrager voorzien moet worden om te controleren of eventuele shedding van de vector plaatsvindt. De COGEM heeft destijds geconcludeerd dat shedding van AAV en rAAV niet uitgesloten kon worden (5) mede gezien de aanwezigheid van replicatie-competent AAV (rcAAV) in het vaccin.

Aspecten van de vector

Voor de insertie van de prostaattumorcellijnen met hgGM-CSF wordt gebruik gemaakt van een virale vector die is afgeleid van AAV. AAV is een enkelstrengs DNA virus dat integreert in het gastheergenoom (14). Infecties met AAV komen wereldwijd en frequent voor, maar gaan voor zover bekend niet gepaard met een ziektebeeld. AAV behoort tot de familie *Parvoviridae* en is een dependovirus dat afhankelijk is van de activiteit van een helpervirus. Als helpervirus van AAV kunnen Adenovirussen en Herpes simplex virussen (HSV) optreden (6; 14). Het helpervirus zorgt ervoor dat de geïnfecteerde cel in een zodanige fysiologische staat wordt gebracht dat vermenigvuldiging van AAV mogelijk wordt. Daarnaast levert het helpervirus specifieke functies die AAV mist voor replicatie. Het virus wordt alleen opgemerkt in combinatie met een infectie van een helpervirus. Omdat een infectie met AAV geen ziekte veroorzaakt, wordt AAV gezien als een zeer geschikt virus voor de ontwikkeling van vectoren voor genterapie (4; 7; 9).

De AAV vector die in deze studie wordt gebruikt bevat slechts de minimale hoeveelheid genetisch materiaal van het wildtype virus. De vector bevat alleen de twee 'inverted terminal repeats' (ITR's) die aan de uiteinden van het genetisch materiaal van het AAV virus zitten. Deze ITR's zijn nodig voor het inpakken van

genetisch materiaal in omhulsels van het AAV. Alle overige genetische informatie die codeert voor genproducten van AAV is verwijderd (10). Deze informatie is vervangen door het gen dat codeert voor hgGM-CSF. Door de samenstelling van de AAV vector is deze niet meer in staat om zichzelf te vermenigvuldigen. De AAV vector kan nog wel cellen infecteren en zijn genetisch materiaal laten integreren in het genoom. Het gen dat codeert voor hgGM-CSF wordt geplaatst achter een cytomegalovirus (CMV) promotor tussen de ITR's. Deze promotor zorgt voor een voortdurend hoge expressie van genen die erachter zijn geplaatst in cellen van vrijwel alle weefseltypen. De CMV promotor codeert niet voor enig genproduct en kan daarom geen van de symptomen van een CMV infectie veroorzaken. Verder zijn in de AAV vector niet-coderende sequenties aanwezig van een β -globine gen. Dit zijn sequenties van een intron en een sequentie die codeert voor een polyadenyleringssignaal.

Productie van de vector

Voor de productie van de AAV virusdeeltjes wordt gebruik gemaakt van een helperplasmide, een helper adenovirus en een productiecellijn (13). Het helperplasmide codeert voor de aanmaak van de AAV eiwitten die niet door de vector worden gemaakt. De AAV vector wordt samen met het helperplasmide in één cellijn gebracht, waarna de cellen geïnfecteerd worden met een helper adenovirus. Het lysaat van deze cellen bevat virusdeeltjes, die in een aantal stappen worden gezuiverd van adenovirus en celresten. Als gevolg van dit productiesysteem kan tijdens het productieproces hergroepering van genetisch materiaal plaatsvinden doordat de ITR's van de vector gekoppeld worden aan de overige genetische informatie van AAV. Hierdoor kunnen DNA moleculen ontstaan die functioneel overeenkomen met de genetische informatie van het wildtype AAV. Bij het beschreven productieproces ontstaan daardoor twee soorten AAV virusdeeltjes. Dit zijn enerzijds virusdeeltjes die de vector dragen, ook wel rAAV ('recombinant AAV') genoemd, en anderzijds virusdeeltjes die na infectie in staat zijn zich te vermenigvuldigen, rcAAV ('replicatie competent' AAV) genoemd. Gezuiverde batches van rAAV die zijn vervaardigd met de huidige productiesystemen bevatten ongeveer één rcAAV deeltje op 10.000 deeltjes rAAV.

Aspecten van de insert

Een groot deel van de AAV sequenties is vervangen door sequenties die coderen voor de aanmaak van de humane granulocyt macrofaag kolonie stimulerende factor, hgGM-CSF. Het hgGM-CSF eiwit is een cytokine en stimuleert de groei en ontwikkeling van voorlopercellen van het immuunsysteem, en effectorcellen zoals dendritische cellen, macrofagen en neutrofielen (12). Expressie van een cytokine zoals hgGM-CSF, leidt tot een verminderde tolerantie van het immuunsysteem,

waardoor tumorcellen moeilijker aan het immuunsysteem kunnen ontsnappen. Daarnaast stimuleert hgGM-CSF bovendien de activiteit van onder meer dendritische cellen, die een rol spelen in de antigeen presentatie (12). De verwachting is dat expressie van hgGM-CSF door de prostaattumorcellijnen tot gevolg zal hebben dat een immuunrespons wordt opgewekt tegen de tumorantigenen die door de vaccincellen tot expressie worden gebracht (2; 3).

Aspecten van de cellijnen

Met de gezuiverde AAV vectordeeltjes worden buiten het lichaam van de patiënt twee prostaattumorcellijnen, PC-3 en LNCaP, geïnfecteerd (11). PC-3 is oorspronkelijk geïsoleerd uit bot metastases van een patiënt en LNCaP uit prostaatkanker lymfeklier metastases. Beide cellijnen zijn afkomstig van de ATCC (American Type Culture Collection). Na infectie met de AAV vectordeeltjes worden cellen geselecteerd waarin de vector stabiel geïntegreerd is in het genoom. De uit PC-3 verkregen genetisch gemodificeerde cellijn wordt aangeduid met CG1940 en die uit LNCaP met CG8711. De constructie en productie van deze cellijnen is uitgevoerd onder Good Manufacturing Practice (GMP), waarbij getest is op afwezigheid van endotoxines, mycoplasma, runder en varkens virussen, *Hepatitis B en C Virus*, *Human Immunodeficiency Virus (HIV-1 en HIV-2)*, *Human T-cell Lymphotropic Virus-1 en – 2*, *Human Herpes Virus Type 6 en 7*, *Cytomegalovirus*, *Human Parvovirus 19* en *Epstein Barr Virus*. De cellen worden herhaaldelijk gecontroleerd op afwezigheid van rAAV en rcAAV. Het vaccin bestaat uit een gelijke hoeveelheden van de cellen CG1940 en CG8711 die intradermaal worden toegediend.

Interactie ggo en de patiënt en zijn omgeving

De dosis die de patiënten toegediend krijgen bevat zoals hieronder nader uiteengezet geen één AAV virusdeeltjes. Hierdoor kan de toediening van zelf niet leiden tot verspreiding van de vector in het milieu. Gezien het feit dat het vaccin geen rcAAV bevat, is reactivering van de vector na toediening onwaarschijnlijk. De aanwezigheid van rcAAV is een eerste voorwaarde voor reactivering van de vector. De cellen in het vaccin zijn voorafgaand aan de toediening zodanig bestraald, dat geen celdeling meer kan plaatsvinden. De cellen zijn echter nog wel in staat om het hgGM-CSF te produceren (2). Na injectie zullen volgens de aanvrager de cellen ongeveer vier dagen bij de injectieplaats zitten waarna ze geëlimineerd worden door het immuunsysteem. Gedurende deze tijd zal hgGM-CSF geproduceerd worden en in het serum terecht komen. Naast het vaccin wordt ook het antilichaam MDX-010 in oplopende dosering aan de patiënt toegediend. Aan deze laatste toediening zijn risico's

verbonden voor de patiënt, zoals het ontstaan van autoimmuunziekten als gevolg van stimulering van het immuunsysteem. De risico's blijven echter beperkt tot de patiënt, aangezien het antilichaam MDX-010 uitsluitend aan de patiënt wordt toegediend en het zich niet in de omgeving kan verspreiden. De patiënten worden bij de eerste toediening van het antilichaam en het vaccin in het ziekenhuis opgenomen. Bij latere toediening blijven zij in observatie gedurende een half uur na de toediening.

Beschouwing en risicoanalyse

De in deze studie gebruikte vector bevat alleen de ITR's van het wildtype AAV die nodig zijn voor het inpakken van genetisch materiaal in een virusdeeltje. Alle overige genetische informatie die codeert voor genproducten van AAV is verwijderd en vervangen door het gen dat codeert voor hgGM-CSF (10). Hierdoor kan de recombinante AAV vector alleen nog cellen infecteren, maar niet meer repliceren. Een CMV promotor is geplaatst vóór het transgen. Deze promotor codeert echter niet voor enig genproduct en kan daarom volgens de COGEM geen symptomen van een CMV infectie veroorzaken.

Voor de productie van de vector is een helperplasmide noodzakelijk die de benodigde eiwitten tot expressie brengt die afwezig zijn in de vector. Bij de virusproductie vindt hergroepering van genetisch materiaal plaats, waardoor virusdeeltjes ontstaan die de vector dragen (rAAV) en ook replicatie-competent AAV (rcAAV). De gezuiverde batches bevatten 10^{-4} rcAAV per rAAV. AAV is een helpervirus-afhankelijk virus dat voor replicatie afhankelijk is van co-infectie van de gastheercel door een adeno- of herpesvirus. In afwezigheid van een helpervirus zal het rcAAV slechts stabiel in het genoom van de gastheer integreren en latent aanwezig blijven. Bij een acute infectie met een adeno- of herpesvirus kan rcAAV zich gaan vermenigvuldigen. Opgemerkt dient te worden dat AAV onder bepaalde condities ook in afwezigheid van helpervirus kan repliceren (8). Als gevolg van de aanwezigheid van rcAAV in het vaccin kan niet uitgesloten worden dat shedding van de vector plaatsvindt na toediening aan de patiënt. Derhalve heeft de COGEM bij eerdere studies geadviseerd (CGM/010702-02 en CGM/011129-03) dat een monitoringsprotocol door de aanvrager voorzien moet worden om te controleren op shedding.

In de huidige aanvraag worden de geïnfecteerde prostaattumorcellijnen uitvoerig gecontroleerd op afwezigheid van rAAV en rcAAV vóórdat de cellen aan de patiënt toegediend worden. Tussen de herhaalde controles heeft een aanzienlijke expansie plaatsgevonden van de celbanken. Extracellulair virus dat geassocieerd is met de buitenkant van de cel zal door herhaalde trypsinisatie procedures gedurende de expansie van de celbanken zijn verwijderd. Bij de trypsinisatie worden de eiwit-

gemedieerde alsmede electrostatische interacties verbroken, zodat de cellen verder gekweekt kunnen worden. Hierdoor zal ook de interactie van de virusdeeltjes die aan de cel geassocieerd zijn verbroken worden. Daarbij kon met behulp van een PCR methode geen intracellulair AAV DNA worden aangetoond. Derhalve is de COGEM is van mening dat het niet verwacht mag worden dat de batches die aan patiënten worden toegediend rAAV en rcAAV bevatten.

De genetisch gemodificeerde prostaattumorcellijnen zijn voor toediening aan de patiënt behandeld met ioniserende straling, waardoor zij zich niet meer kunnen vermenigvuldigen. De gebruikte dosis is 40% hoger dan de minimale dosis waarbij de cellen niet meer in staat zijn om te delen. In die zin gaat het om toediening van afgedode cellen. De patiëntendosis bevat minder dan één rAAV of rcAAV deeltje. De aanwezigheid van rcAAV is een voorwaarde voor eventuele reactivering van de vector. De kans dat er vector virussen worden vrijgemaakt wordt sterk gereduceerd doordat voor replicatie een gelijktijdige infectie van een vaccincel door een wild type AAV én een helpervirus nodig zijn. Dit zou alleen op kunnen treden wanneer cellen in het vaccin direct na toediening aan de patiënt door lokaal op of in de huid aanwezige AAV virussen en adenovirussen en/of herpes virussen worden geïnfecteerd. De tijdspanne waarin dit kan gebeuren is sterk beperkt doordat de bestraalde cellen relatief snel zullen worden opgeruimd. De COGEM acht het bovendien onwaarschijnlijk dat er zich significante hoeveelheden vrij adenovirus en/of herpesvirus zullen bevinden op de plaats van vaccinatie. Derhalve acht de COGEM de kans op reactivering van rAAV uit het toegediende vaccin verwaarloosbaar klein. Toediening van het antilichaam MDX-010 aan de patiënt alsmede expressie van het hgGM-CSF zal tot gevolg hebben dat het immuunsysteem gestimuleerd wordt. De COGEM is van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat de aanwezigheid van het antilichaam MDX-010 en/of het cytokine hgGM-CSF de reactivering van de vector uit de vaccincellen zal beïnvloeden.

Conclusie en Advies

De COGEM is van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn van de beschreven fase I klinische studie, waarbij patiënten prostaattumorcellijnen toegediend krijgen die genetisch gemodificeerd zijn met een rAAV vector waarin de sequentie voor hgGM-CSF gekloneerd.

Referenties

1. Koningin Wilhelmina Fonds voor de Nederlandse Kankerbestrijding. Website:

www.kwf.nl (27-02-2004)

2. Dranoff, G. (2002). GM-CSF-based cancer vaccines. *Immunol Rev* **188**, blz. 147-54
3. Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., and Mulligan, R. C. (1993). Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, blz. 3539-43
4. El-Aneed, A. (2004). An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release* **94**, blz. 1-14
5. Kay, M. A., Manno, C. S., Ragni, M. V., Larson, P. J., Couto, L. B., McClelland, A., Glader, B., Chew, A. J., Tai, S. J., Herzog, R. W., Arruda, V., Johnson, F., Scallan, C., Skarsgard, E., Flake, A. W., and High, K. A. (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* **24**, blz. 257-61
6. Knipe, M. D. and Howley, P. M. (2001). *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
7. Lai, C. M., Lai, Y. K., and Rakoczy, P. E. (2002). Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol* **21**, blz. 895-913
8. Meyers, C., Mane, M., Kokorina, N., Alam, S., and Hermonat, P. L. (2000). Ubiquitous human adeno-associated virus type 2 autonomously replicates in differentiating keratinocytes of a normal skin model. *Virology* **272**, blz. 338-46
9. Monahan, P. E. and Samulski, R. J. (2000). Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons? *Mol Med Today* **6**, blz. 433-40
10. Muzyczka, N. (1992). Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **158**, blz. 97-129
11. Nicklin, S. A., Dishart, K. L., Buening, H., Reynolds, P. N., Hallek, M., Nemerow, G. R., Von Seggern, D. J., and Baker, A. H. (2003). Transductional and transcriptional targeting of cancer cells using genetically engineered viral vectors. *Cancer Lett* **201**, blz. 165-73
12. Roitt, I., Brostoff, J., and Male, D. (1996). *Immunology*. Mosby. London.
13. Smith-Arica, J. R. and Bartlett, J. S. (2001). Gene therapy: recombinant adeno-associated virus vectors. *Curr Cardiol Rep* **3**, blz. 43-9
14. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego