

Aan de minister van  
Infrastructuur en Waterstaat  
drs. B. Visser  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 08 december 2021  
**KENMERK** CGM/211208-02  
**ONDERWERP** Advies klinische studie gg-AAV met CRISPR

Geachte mevrouw Visser,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag getiteld 'Open-label, single ascending dose study to evaluate the safety, tolerability, and efficacy of EDIT-101 in adult and pediatric participants with Leber Congenital Amaurosis Type 10 (LCA10), with centrosomal protein 290 (CEP290)-related retinal degeneration caused by a compound heterozygous or homozygous mutation involving c.2991+1655A>G in intron 26 (IVS26) of the CEP290 gene ("LCA10-IVS26")' (IM-MV 21-004\_000) van de Radboud Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een klinische studie met een vector afgeleid van het Adeno-associated virus (AAV). De AAV-vector wordt toegediend aan patiënten met een specifieke vorm van netvliesdegeneratie en verlies van het gezichtsvermogen (Leber congenitale amaurosis type 10). In deze vector zijn CRISPR/Cas9 sequenties opgenomen, waarmee een defect in het gen, CEP290, dat verantwoordelijk is voor de netvliesdegeneratie gerepareerd kan worden. In deze klinische studie zal de effectiviteit en veiligheid van deze therapie in volwassen en pediatrische patiënten onderzocht worden.

De COGEM heeft eerder een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met AAV-vectoren opgesteld en geoordeeld dat de risico's voor mens en milieu bij klinische studies met deze vectoren verwaarloosbaar klein zijn, mits aan een aantal randvoorwaarden wordt voldaan. Anders dan bij eerdere studies met AAV-vectoren, wordt in de onderhavige klinische studie voor het eerst gebruik gemaakt van een AAV-vector die sequenties bevat voor CRISPR/Cas9. Het CRISPR/Cas9 systeem zal alleen werkzaam zijn in netvliescellen en is specifiek gericht op de reparatie van het defecte CEP290-gen. De kans dat derden aan de vector blootgesteld worden, acht de COGEM zeer klein. In het geval derden worden blootgesteld, worden hiervan geen schadelijke effecten verwacht. Alles in ogenschouw nemende is de COGEM van oordeel dat risico's van de toepassing van EDIT-101 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. ing. Sybe Schaap  
Vorzitter COGEM

- c.c.
- Drs. Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
  - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal
  - Dr. ir. M.M.C. Gielkens, Coördinator Loket Genterapie
  - Dr. K.R.J. Vanmolkot, Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek
  - Drs. K.E. Kok, Ministerie van VWS

# Klinische studie met AAV-vector met CRISPR-associated protein (Cas)9 ter behandeling van patiënten met Leber congenitale amaurosis type 10 (LCA10)

## COGEM advies CGM/211208-02

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een klinische studie met een Adeno-associated virus (AAV)-vector genaamd EDIT-101, waarin sequenties opgenomen zijn van het *Staphylococcus aureus* (Sa) CRISPR associated protein (Cas) 9 (SaCas9) en 'guide RNA's' (gRNA's) gericht op het humane 'centrosomal protein 290' (CEP290) gen (IM-MV 21-004). De therapie is bedoeld voor patiënten met Leber congenitale amaurosis type 10 (LCA10), dat veroorzaakt wordt door een mutatie (IVS26) in een intron van het CEP290-gen. Door deze mutatie ontstaat een 'splice-donor site', waardoor een cryptisch exon gevormd wordt en een stopcodon geïntroduceerd wordt in het mRNA. Hierdoor wordt de functie van het CEP290-eiwit in fotoreceptorcellen van het netvlies verstoord, dat gepaard gaat met degeneratie van het netvlies en verlies van het gezichtsvermogen.

De vergunningaanvraag is afkomstig van de Radboud Universiteit in Nijmegen. In deze klinische studie zal de effectiviteit en veiligheid van deze therapie in volwassen en pediatrische patiënten onderzocht worden.

### 2. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2019 in een advies een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met AAV-vectoren opgesteld en geoordeeld dat de risico's voor mens en milieu bij klinische studies met deze vectoren verwaarloosbaar klein zijn, mits aan een aantal randvoorwaarden wordt voldaan.<sup>1</sup> Deze randvoorwaarden zijn in 2020 geüpdatet,<sup>2</sup> en zijn als volgt:

- de 'inverted terminal repeats' (ITR's) en capsid-eiwitten zijn afkomstig van AAV's, dat wil zeggen virussen behorende tot het genus *Dependoparvovirus* die voor *in vivo* replicatie afhankelijk zijn van een helpervirus<sup>a</sup>;
- indien ten behoeve van de vectorproductie gebruik gemaakt is van helpervirus, dient deze te zijn geïnactiveerd of verwijderd;
- de gehele nucleotidensequentie van het AAV-vectorgenoom is vastgesteld en dient ter verificatie te zijn vergeleken met de nucleotidensequentie van de beoogde vector;
- het gebruikte transgen codeert niet voor sequenties die in staat zijn de vector te complementeren, of voor schadelijke genproducten of (proto)oncogenen.

In navolging op een nadere discussie over de moleculaire karakterisering van de AAV-vectoren acht de COGEM de moleculaire karakterisering eveneens voldoende wanneer:

- vectorkaartjes en beschrijvingen van de productieplasmiden worden overlegd door de aanvrager;

---

<sup>a</sup> Zoals *Adeno-associated dependo-parvovirus A*, *Adeno-associated dependoparvovirus B*, *Avian dependoparvovirus 1*, *Chiropteran dependoparvovirus 1*, *Pinniped dependoparvovirus 1* en *Squamate dependoparvovirus 1*

- de aanvrager heeft aangeven dat deze plasmiden gesequenced zijn en dat de AAV-sequenties in de plasmiden identiek zijn aan de beoogde sequenties.

Anders dan eerdere klinische studies met AAV-vectoren waarover de COGEM in het verleden heeft geadviseerd, wordt bij de onderhavige studie een SaCas9 met gRNA's als transgen gebruikt.

### 3. Samenstelling en productie van EDIT-101

De AAV-vector in de onderhavige aanvraag bevat ITR's afkomstig van AAV2 en wordt ingepakt in capsid-eiwitten afkomstig van AAV5. Voor de productie wordt gebruik gemaakt van drie plasmiden: de AAV-vector plasmide waarin zich het transgen bevindt, een AAV-packaging plasmide met de *rep* en *cap* sequenties, en een helperplasmide dat alleen de adenovirale genen bevat die nodig zijn voor AAV replicatie, namelijk E2A, E4 en 'virus-associated' (VA) RNA. Het E1-gen dat eveneens nodig is voor de replicatie is geïntegreerd in de HEK293 cellen, waarin de vector-productie plaatsvindt.

De AAV-vector EDIT-101 (AAV5-CEP290gRNA323/64-GRK1-SaCas9) bevat twee gRNA sequenties, CEP290-323 en CEP290-64 die de mutatie in intron 26 flankeren en elk aangestuurd worden door een U6-promotor. Het SaCas9-gen wordt aangestuurd door de fotoreceptor-specifieke 'human G protein-coupled receptor kinase 1' (GRK1) promotor. Tussen de GRK1-promotor en het SaCas9-gen bevindt zich nog een Simian virus 40 (SV40) 'splice donor/splice acceptor' sequentie, en voorafgaand aan het startcodon bevindt zich een Kozak consensussequentie voor maximale SaCas9 eiwitexpressie. Het SaCas9-gen is codon-geoptimaliseerd voor expressie in humane cellen en bevat N-terminale en C-terminale 'nuclear localization signals' (NLS) en een minimaal polyadenyleringssignaal.

### 4. De klinische studie in het kort

De aanvrager meldt dat maximaal 60 patiënten zullen deelnemen aan de studie. De patiënten zullen een enkele subretinale injectie ontvangen (0,3 ml), waarbij een lage ( $6 \times 10^{11}$  vectorgenomen (vg)/ml), gemiddelde ( $1,1 \times 10^{12}$  vg/ml) of hoge dosis ( $3 \times 10^{12}$  vg/ml) toegediend zal worden. De patiënten zullen 3 dagen voorafgaand aan de therapie, gedurende en na afloop van de therapie behandeld worden met prednison om het immuunsysteem te onderdrukken. Deelnemers worden gevraagd minstens 12 maanden na de behandeling geen sperma of bloed te doneren. Gedurende de studie zullen op verschillende tijdpunten monsters afgenomen worden, waarbij onder andere onderzoek gedaan wordt naar uitscheiding van vectorgenoom in bloed, neusslijmvlies, sperma en traanvocht met behulp van qPCR.

Na toediening van EDIT-101 in het oog, zal SaCas9 in de fotoreceptorcellen in het netvlies van de patiënt tot expressie komen. Het SaCas9 zal met behulp van de gRNA's en de SaCas9 'PAM recognition sequence' NNGRRT, dubbelstrengs breuken aanbrengen bij de mutatie in het intron 26 van het humane CEP290-gen in de fotoreceptorcellen van de retina. Bij reparatie van deze breuk in de gastheercel kunnen o.a. deleties of inversies ontstaan,<sup>3</sup> waardoor de IVS26-mutatie en de daarmee verbonden 'splice-donor' site opgeheven kunnen worden.

De mate van uitscheiding van EDIT-101 wordt onderzocht in een fase 1/2 studie. Uit de data die tot dusver beschikbaar zijn, blijkt dat EDIT-101 vectorsequenties kortstondig en in lage hoeveelheden gedetecteerd worden in traanvocht en bloed tot 7 dagen na toediening. Bij behandeling met EDIT-101

zullen standaardmaatregelen met betrekking tot ziekenhuis-hygiëne getroffen worden. De patiënt zal de eerste dag na de behandeling een ooglapje dragen. De patiënten en/of verzorgers zullen instructies ontvangen over hoe om te gaan met afvalmateriaal tijdens de eerste 7 dagen na de behandeling.

## **5. Overwegingen**

De COGEM heeft een generieke milieurisicobeoordeling uitgebracht waarin de randvoorwaarden zijn gedefinieerd voor klinische studies met AAV-vectoren.<sup>1,2</sup> Anders dan eerdere studies met AAV-vectoren, betreft de onderhavige klinische studie een eerste aanvraag voor het gebruik van een AAV-vector met CRISPR/Cas9 sequenties. Hieronder gaat de COGEM in op de verschillende milieurisico-aspecten aan de hand van de generieke milieurisicobeoordeling.

### **5.1 ITR en capsid-eiwitten**

In het generieke COGEM advies voor klinische toepassingen met AAV-vectoren heeft de COGEM gesteld dat de ITR's en capsid-eiwitten afkomstig moeten zijn van AAV's. In de onderhavige studie zijn de ITR's afkomstig van AAV2 en de capsid-eiwitten van AAV5. Hiermee voldoet de nu ter beoordeling voorliggende klinische studie aan dit criterium van het generieke advies.

### **5.2 Aanwezigheid van helpervirus in vector batches**

In het generieke COGEM advies, heeft de COGEM gesteld dat als er tijdens de vectorproductie gebruik is gemaakt van helpervirus, dit vervolgens geïnactiveerd of verwijderd moet worden. Voor de productie van de EDIT-101 vector wordt in plaats van een helpervirus, een helperplasmide gebruikt die de benodigde 'helpergenen' van het adenovirus *in trans* aanlevert en een cellijn die een 'helpergen' complementeert. Dit criterium is daarom niet relevant voor de nu ter beoordeling voorliggende klinische studie.

### **5.3. Moleculaire karakterisering**

In de onderhavige aanvraag zijn vectorkaartjes en beschrijvingen van de productieplasmiden in het vertrouwelijk deel van de aanvraag overlegd. Er is aangegeven dat de productieplasmiden gesequenced zijn en dat de sequenties in de plasmiden identiek zijn aan de beoogde sequentie. Tevens is de volledige referentiesequentie van de klinische vector EDIT-101 aangeleverd in het vertrouwelijke deel van de aanvraag.

Bij de ontwikkeling van de 'Drug Substance lots' wordt Sanger-sequencing toegepast om de sequentie binnen de ITR's te bevestigen en wordt in een later stadium ook gesequenced met behulp van 'next generation sequencing'. Als onderdeel van de 'final release testing' worden 'Drug Product lots' nogmaals gesequenced met behulp van Sanger-sequencing.

De COGEM is van oordeel dat de aanvrager de moleculaire karakterisering adequaat heeft uitgevoerd.

### **5.4 Eigenschappen van het transgen**

In deze aanvraag wordt gebruik gemaakt van een zogenaamde 'gene-editing' techniek, waarbij met SaCas9 gerichte veranderingen aangebracht worden in het DNA met behulp van het gRNA. Bij de

therapie in de onderhavige aanvraag zijn verschillende mechanismen toegepast om de aangebrachte modificatie te beperken tot het DNA in fotoreceptorcellen.

Het SaCas9 construct staat onder controle van de fotoreceptorcel-specifieke GRK1-promotor. In een experiment met *post mortem* retina-weefsel en een vergelijkbare AAV-vector met GFP onder de controle van de GRK1-promotor (AAV5-GRKI-GFP), is GFP-expressie alleen geobserveerd in de fotoreceptorcellen van het netvlies.<sup>3</sup> De COGEM merkt op dat ook de AAV-ITR's de promotoractiviteit van het transgen kunnen beïnvloeden.<sup>4</sup> Zij acht het derhalve niet geheel uitgesloten dat het transgen mogelijk ook in andere celtypen laag tot expressie kan komen. Echter, door de toedieningswijze in de retina is de kans op verspreiding van de AAV-vector naar perifere weefsel zeer klein.

De gebruikte gRNA-sequenties komen overeen met de specifieke intron 26 sequenties in het humane CEP290-gen. Uit onderzoek naar onbedoelde target sites (zogenaamde 'off-target sites') voor EDIT-101 (SaCas9 met 64gRNA en 323gRNA) met behulp van *in silico* voorspellingen gevolgd door 'targeted next generation sequencing' in verschillende humane cellijnen en retina-weefsel na transductie met EDIT-101, zijn geen van de voorspelde potentiële off-target sites geverifieerd.<sup>3</sup>

### **5.5 Verspreiding van EDIT-101 in het milieu en blootstelling van derden**

EDIT-101 vectorsequenties kunnen gedurende 7 dagen in lage hoeveelheden gedetecteerd worden in traanvocht en bloed. Het is niet bekend of het hier ook infectieuze deeltjes betreft. De aanvrager stelt dat de mate van blootstelling van derden aan uitgescheiden EDIT-101 zeer beperkt zal zijn. De patiënt en verzorgers worden geïnstrueerd hygiënemaatregelen te hanteren bij handelingen met afvalmateriaal. Daarnaast wijst de aanvrager erop dat de kleine hoeveelheden EDIT-101 die worden uitgescheiden, niet in staat zijn cellen te transduceren vanwege de lage infectiositeit van AAV-vectoren.<sup>5</sup> Tevens wordt de deelnemers aangeraden minstens 12 maanden geen bloed te doneren. De COGEM wijst erop dat voor eenzelfde periode ook moet worden aangeraden van orgaandonatie af te zien.

In het onwaarschijnlijke geval dat er toch transductie plaatsvindt in derden, zal de kans op gene-editing in de meeste celtypen zeer klein zijn: gezien het gebruik van een fotoreceptorcel-specifieke promotor (GRK1) voor de expressie van SaCas9 zal de expressie zeer laag tot afwezig zijn in andere celtypen. De kans dat de AAV-vector via reguliere blootstelling de retina van derden bereikt, is zeer klein.

## **6. Conclusie en advies**

De COGEM is van oordeel dat de AAV-vector in onderhavige aanvraag voldoet aan de criteria van de generieke milieurisicobeoordeling voor klinische studies met AAV-vectoren. Ten aanzien van het gebruik van SaCas9 als transgen merkt zij op dat het werkingsmechanisme gekoppeld is aan de gRNA's die de plaats van de DNA-breuk bepalen. In de onderhavige aanvraag zijn de gRNA's specifiek voor een intron in het CEP290-gen. Uit onderzoek naar mogelijke 'off-target sites' is geen 'off-target editing' op deze plaatsen gedetecteerd. Hierbij dient opgemerkt te worden dat een 'off-target effect' niet geheel uitgesloten kan worden op basis van dit onderzoek. Breuken in het DNA komen ook onder natuurlijke omstandigheden voor en worden door de cellulaire reparatie-machinerie gerepareerd, waarbij mutaties in het DNA kunnen ontstaan. Door het gebruik van een fotoreceptorcel-specifieke promotor wordt expressie van SaCas9, en daarbij mogelijk 'off-target' effecten van SaCas9, beperkt tot de fotoreceptor-

cellen in de retina. De mate van uitscheiding is beperkt en mogelijk onvoldoende om infectie bij derden te bewerkstelligen. Daarnaast worden patiënten en verzorgers geïnstrueerd hoe om te gaan met potentieel besmet afvalmateriaal, waarmee onbedoelde blootstelling verder wordt voorkomen. Indien derden toch blootgesteld worden aan EDIT-101, zal het SaCas9 alleen tot expressie komen in de retina. In het theoretische geval dat de AAV-vector de retina van derden bereikt, zal de expressie van SaCas9 niet tot een schadelijk effect leiden omdat de gRNA-gestuurde mutaties die veroorzaakt worden door SaCas9 (o.a. deletie of inversie) in een intron plaatsvindt en derhalve geen invloed heeft op de productie en het functioneren van het CEP290-eiwit.

Alles in ogenschouw nemende is de COGEM van oordeel dat risico's van de toepassing van EDIT-101 voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

### **7. Additionele opmerking**

Bij toepassingen van AAV-vectoren met CRISPR/Cas9 kan in sommige gevallen integratie van de gehele AAV-vectorsequentie of gedeeltes hiervan plaatsvinden op de locatie waar de breuk wordt aangebracht of in de directe omgeving daarvan. De COGEM merkt op dat integratie van CRISPR/Cas9 sequenties uit de AAV-vector, al dan niet op de target site of in de buurt daarvan, overeenkomt met de beschrijving van werkzaamheden met 'gene drives', zoals weergegeven in Bijlage 5, inschalingsartikel 5.0 van de Regeling ggo; *'Activiteiten met organismen die in staat zijn tot geslachtelijke voortplanting waarbij gebruik wordt gemaakt van genetische informatie die codeert voor een sequentie-specifiek endonuclease dat kan integreren op of nabij een positie in het gastheergenoom die overeenkomt met de knipplaats van het endonuclease'*. Deze activiteiten worden standaard ingeschaald op het hoogste inperkingsniveau (IV).

De COGEM is zich ervan bewust dat dit inschalingsartikel betrekking heeft op 'Ingeperkt Gebruik' en niet op 'Introductie in het Milieu', en dat de mens conform de Europese regelgeving geen ggo kan zijn, en dat dit inschalingsartikel derhalve niet van toepassing is op deze vergunningaanvraag. Echter, ze wijst erop dat bij dierexperimenten met een vergelijkbare vector onder 'Ingeperkt Gebruik' waarbij integratie van AAV-vectorsequenties, waaronder CRISPR/Cas9, plaats kan vinden, niet altijd sprake is van een 'gene drive' die zich door de populatie kan verspreiden. Dit geldt alleen wanneer integratie in kiembaancellen optreedt. Teneinde onnodige verwarring te voorkomen over wanneer het inschalingsartikel 5.0 van toepassing is, adviseert de COGEM de tekst aan te passen.

### **Referenties**

1. COGEM (2019). Generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met AAV-vectoren. COGEM advies CGM/190905-01
2. COGEM (2020). Advies betreffende procedures van markttoelatingen van medische ggo-producten die onder de generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies vallen. COGEM advies CGM/201214-02

3. Maeder ML *et al.* (2019). Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat. Med.* 25: 229-233
4. Earley LF *et al.* (2020). Adeno-associated virus serotype-specific inverted terminal repeat sequence role in vector transgene expression. *Hum. Gene Ther.* 31: 151-162
5. Qian R *et al.* (2020). Directed Evolution of AAV Serotype 5 for Increased Hepatocyte Transduction and Retained Low Humoral Seroreactivity. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 20: 122-132