

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag


DATUM 11 maart 2022
KENMERK CGM/220311-01
ONDERWERP Klinische toepassing AAV-vectoren met 'targeted nucleases' zoals CRISPR-Cas9

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de toepassing van AAV-vectoren met 'targeted nucleases' zoals CRISPR-Cas9 als insert van bureau GGO (COG 21-008), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

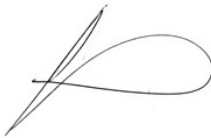
De COGEM is gevraagd of de toepassing van 'targeted nucleases', zoals CRISPR-Cas9, in AAV-vectoren in klinische studies voldoen aan de voorwaarden van de generieke milieurisicobeoordeling voor AAV-vectoren, en of (aanvullende) inperkingsmaatregelen nodig zijn. Tevens is gevraagd of dit ook geldt voor toekomstige gene-editing toepassingen in combinatie met AAV-vectoren. Onder 'targeted nucleases' worden bepaalde enzymen (nucleases) verstaan die breuken kunnen aanbrengen op specifieke posities in het DNA. Met deze toepassingen kunnen gerichte wijzigingen in het DNA aangebracht worden (gene-editing). De 'targeted nucleases' omvatten CRISPR-Cas-systemen, 'zinc-finger nucleases' (ZFN's), 'Transcription Activator Like Effector Nucleases' (TALEN's) en meganucleases. Er wordt met name veel onderzoek gedaan naar verschillende CRISPR-Cas-systemen. Naast gewenste effecten in de patiënt, kunnen 'targeted nucleases' ook ongewenste effecten hebben, zowel op de beoogde positie in het DNA als op andere posities (off-target effecten). Dit is voornamelijk een risico voor de patiënt, echter door uitscheiding van vectordeeltjes kunnen derden potentieel blootgesteld worden aan deze vectoren. Hoewel de blootstelling van derden aan AAV-vectoren met 'targeted nucleases' weliswaar beperkt zal zijn, kan niet generiek uitgesloten worden dat dit mogelijk leidt tot ongewenste effecten. De COGEM adviseert daarom bij klinische toepassingen van 'targeted nucleases' in AAV-vectoren als additionele voorwaarde op te nemen dat er aanvullende hygiënemaatregelen worden toegepast na toediening van de AAV-vector. Hiervan kan afgeweken worden, indien een aanvrager hier een gedegen onderbouwing voor aanlevert. De COGEM signaleert dat AAV-vectoren met CRISPR-Cas sequenties, of sequenties van andere 'targeted nucleases', een verhoogde kans hebben op integratie in het genoom en adviseert derhalve dat dergelijke AAV-vectoren niet toe-



gediend mogen worden in de geslachtsorganen van deelnemers aan klinische studies om zo eventuele kiembaanmodificatie te voorkomen. Tenslotte is de COGEM van oordeel dat ook toekomstige gene-editing toepassingen in combinatie met een AAV-vector onder de generieke milieurisicobeoordeling vallen, mits deze toekomstige toepassingen een vergelijkbare werking hebben als de huidige bekende systemen en met inachtneming van de eerdergenoemde aanvullende voorwaarden.

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

Klinische toepassing van AAV-vectoren met ‘targeted nucleases’ zoals CRISPR-Cas9

COGEM advies CGM/220311-01

1. Inleiding

De COGEM is om een generiek advies gevraagd betreffende de toepassing van ‘targeted nucleases’, zoals CRISPR-Cas9, in AAV-vectoren in klinische studies (COG 21-008). De vraag is of dergelijke vectoren voldoen aan de voorwaarden van de generieke milieुरisicobeoordeling voor AAV-vectoren en of (aanvullende) inperkingsmaatregelen nodig zijn. Tevens is de vraag of bovenstaande ook geldt voor toekomstige gene-editing toepassingen in combinatie met AAV-vectoren.

Onder targeted nucleases worden nucleases verstaan die breuken kunnen aanbrengen op specifieke posities in het DNA. Hieronder vallen CRISPR-Cas-systemen, waarbij de herkenning van de klievingssequenties wordt geleid door het ‘guide RNA’ (gRNA), maar ook ‘Zinc Finger Nucleases’ (ZFN’s), ‘Transcription Activator Like Effector Nucleases’ (TALEN’s) en de meganucleases waarbij de herkenning van de klievingssequenties gebaseerd is op een DNA-eiwit interactie (zie ook paragraaf 1.5 voor meer informatie over deze toepassingen). Er zijn verscheidene preklinische studies uitgevoerd naar toepassingen met AAV-vectoren met ZFN’s^{e.g.1,2,3,4} en meganucleases^{5,6}, maar op dit moment worden hoofdzakelijk CRISPR-Cas toepassingen in AAV-vectoren onderzocht.

1.1 CRISPR-Cas9 gene-editing

‘Clustered regularly interspaced short palindromic repeats’ (CRISPR) ‘associated proteins’ (Cas) systemen zijn afkomstig van bacteriën en archaea, waar ze fungeren als verdedigingsmechanisme tegen virussen en andere vreemde (niet eigen) genetische elementen. In 2012 is een wetenschappelijke publicatie uitgebracht waarin is beschreven op welke manier CRISPR-Cas9 kan worden toegepast om op relatief eenvoudige manier dubbelstrengsbreuken te creëren op specifieke posities in het DNA, waardoor modificatie van het genoom mogelijk is.⁷ Deze publicatie heeft tot een doorbraak geleid in de mogelijkheden van ‘gene-editing’. Inmiddels heeft het gebruik van CRISPR-Cas een grote vlucht genomen, zowel in het fundamentele onderzoek als bij diverse landbouw- en medische toepassingen, en zijn de eerste klinische studies met CRISPR-Cas gaande.⁸

Bij gene-editing met CRISPR-Cas9 wordt gebruik gemaakt van een ribonucleoproteïne (RNP), bestaande uit het Cas9-eiwit in combinatie met een zogenaamd gids RNA (‘guide’ RNA of gRNA). De sequentie van het gRNA-molecuul bepaalt door middel van baseparing de positie waar de twee nucleasedomeinen van Cas9 de DNA-breuk in het genoom aanbrengen. Noodzakelijk voor de klievingsactiviteit is de aanwezigheid van de zogenoemde ‘protospacer adjacent motif’ (PAM) sequentie naast de gRNA-bindingsplaats in het DNA: een korte sequentie van meestal 2 tot 6 nucleotiden ‘downstream’ van de klievingspositie.

De breuk in het DNA kan in dierlijke en menselijke cellen via de aanwezige herstelroutes worden gerepareerd. De meest gebruikte route is ‘non-homologous end joining’ (NHEJ).⁹ Hierbij worden beide DNA-strengen aan elkaar verbonden, waarbij deleties of inserties (indels) op de positie van de breuk

kunnen ontstaan. Indien de oorspronkelijke sequentie behouden blijft, kan het CRISPR-Cas9 systeem opnieuw een breuk aanbrengen. Na NHEJ kunnen genen worden uitgeschakeld door introductie van ‘frameshifts’, of kan het leesraam van een gen worden hersteld door het aanpassen van ‘splice-sites’.^{10,11} Indien er een donorsequentie met het CRISPR-Cas9-systeem wordt meegeleverd, kan de dubbelstrengsbreuk hersteld worden door het inbouwen van een gewenste DNA-sequentie op de positie van de breuk via ‘homology-directed repair’ (HDR).¹² Via deze route is het bijvoorbeeld mogelijk op een accurate manier puntmutaties te herstellen of grote inserties of deleties aan te brengen. HDR is minder foutgevoelig dan NHEJ, maar is alleen actief tijdens enkele fasen in de celcyclus en minder efficiënt.¹³

1.2 Ontwikkelingen in CRISPR-Cas-technieken

In de loop van de jaren is het arsenaal aan mogelijkheden en toepassingen van de CRISPR-Cas-technieken enorm uitgebreid.¹⁴ Daarbij gaat het om aanpassingen aan het Cas9-eiwit zelf, de gRNA’s en de wijze van controleren (reguleren) van het systeem. Hierdoor zijn de uitkomsten van het oorspronkelijke CRISPR-Cas9-systeem efficiënter en betrouwbaarder geworden, onder meer door het creëren van Cas-eiwitten met verhoogde specificiteit (bijvoorbeeld ‘high fidelity’ Cas9-HF1¹⁵ of enhanced-specificity eSPCas9¹⁶).¹⁷ Naast het oorspronkelijke Cas9-eiwit dat uit *Streptococcus pyogenes* is geïsoleerd, zijn inmiddels meerdere orthologe eiwitten van Cas9 ontdekt in andere organismen.^{13,27} Deze verschillen bijvoorbeeld in grootte of in de PAM-sequentie die nodig is voor het aanbrengen van de DNA-breuk op de doelsequentie.^{18,19} Het Cas12a-eiwit (oorspronkelijk Cpf1 genoemd) wordt ook frequent ingezet voor gene-editing. DNA-klieving door Cas12a levert een breuk met 5’-overhang op, in tegenstelling tot de ‘blunt-ends’ van Cas9. Ook kan het Cas-eiwit de benodigde gRNA’s zelf verwerken en zijn er dus geen aparte promotoren nodig om meer dan één gRNA tot expressie te brengen.²⁰ Met Cas13 is knippen van RNA mogelijk, bijvoorbeeld als potentiële behandeling van infecties met RNA-virussen.^{21,22}

Het gemodificeerde eiwit nickaseCas (nCas) klieft slechts één van de DNA-strengen doordat één van de nuclease-domeinen is geïnactiveerd. In combinatie met twee gRNA’s, gericht tegen de tegengestelde DNA-strengen, kan een dubbelstrengsbreuk worden gecreëerd met hogere precisie en minder off-target activiteit dan het wildtype enzym (zie ook paragraaf 1.4 *Ongewenste on- en off-target effecten*).²³ Bij deadCas (dCas) zijn beide nuclease-domeinen uitgeschakeld, maar is binding aan het DNA nog steeds mogelijk. Door het koppelen van deze mutanten met specifieke enzymactiviteiten zijn de mogelijkheden van het gebruik van CRISPR-Cas9-systemen verder uitgebreid. Bij ‘base-editing’ bijvoorbeeld wordt dCas9 gekoppeld aan cytidine- of adenosine-deaminase. Bij deze techniek is de mutatie van C naar T of A naar G op een specifieke positie mogelijk.^{24,25} Bij zogenoemde ‘prime-editing’ is het mogelijk om deleties of specifieke inserties aan te brengen, of elk van de twaalf mogelijke puntmutaties te introduceren.²⁶ CRISPR-Cas-technieken spelen ook een grote rol in het aanbrengen van zogenoemde epigenetische veranderingen. Hierbij kan de expressie van genen worden gewijzigd zonder dat de nucleotidenvolgorde van het DNA zelf wordt gewijzigd.²⁷ Epigenetische veranderingen zijn geen onderdeel van de Regeling ggo en zullen derhalve in onderhavig advies buiten beschouwing gelaten worden.

1.3 Toediening van CRISPR-Cas aan proefpersonen

Er zijn verschillende manieren waarop het CRISPR-Cas9 aan proefpersonen of patiënten kan worden toegediend. Bij *ex vivo* toepassingen worden lichaamscellen afgenomen en buiten het lichaam gemodificeerd alvorens weer teruggegeven te worden aan de proefpersoon of patiënt. Modificatie van de cellen kan op vele manieren: via DNA-plasmiden, mRNA-moleculen of door toediening van RNP-complexen bestaande uit het Cas-eiwit en de gRNA's. Ook kunnen hiervoor virale vectoren gebruikt worden, zoals retro- of lentivirale vectoren. Voor *in vivo* toediening van het CRISPR-Cas systeem zijn ook meerdere methodes mogelijk. Onder meer is het gebruik van 'lipid nanoparticles' (LNP's) beschreven, net als AAV-vectoren waarbij de CRISPR-Cas-sequenties in het vectorgenoom zijn geïnsererd. Op dit moment wordt in een klinische studie een AAV-vector met CRISPR-Cas9 toegepast voor de behandeling van de oogziekte Leber congenitale amaurosis type 10 (LCA10),^{11,56} en zijn er preklinische studies gaande voor de behandeling van onder andere de spierziekte Duchenne.^{28,29}

Het Cas9-eiwit uit *S. pyogenes* werd als eerste ingezet voor gene-editing en wordt nog steeds het meeste toegepast. Vanwege de grootte van het Cas9-eiwit (1.368 aminozuren; het gen is 4,1 kb), is de insertie van de coderende sequenties van het CRISPR-Cas-systeem in AAV-vectoren een uitdaging.³⁰ Dit probleem kan omzeild worden door gebruik te maken van twee AAV-vectoren, waarbij de ene vector de Cas9-sequentie als transgen bezit en een tweede de gRNA-sequenties al dan niet in combinatie met een donor-sequentie tot expressie brengt,^{31,32} of door het gebruik van een split-Cas systeem, waarbij het Cas9-gen in twee delen is gesplitst en de genproducten in de cel weer kunnen fuseren tot een actief Cas-eiwit.^{33,34} Echter, voor gene-editing dienen cellen door beide AAV-vectoren getransduceerd te worden, wat een dergelijke aanpak inefficiënt maakt. Om die reden wordt ook het gebruik van kleinere orthologen afkomstig uit andere organismes onderzocht, zoals Cas9 uit *Campylobacter jejuni* (CjCas9)³⁵ of *Staphylococcus aureus* (SaCas9).^{36,29}

1.4 Ongewenste on- en off-target effecten

Hoewel CRISPR-Cas-systemen heel effectief zijn in het aanbrengen van mutaties in het genoom, kunnen ook ongewenste effecten optreden, zowel op de beoogde sequentie ('on-target'), als op andere posities in het genoom ('off-target'). Daarbij kunnen kleine inserties, deleties of puntmutaties geïntroduceerd worden, maar ook grote deleties of herordening van chromosomen.^{37,38,39}

Omdat de ongewenste effecten schadelijk kunnen zijn voor proefpersonen of patiënten, is onderzoek ook gericht op het veiliger maken van de CRISPR-Cas-systemen.^{40,41} Dat heeft nauwkeurigere Cas-eiwitten opgeleverd, zoals bijvoorbeeld eerdergenoemde nCas, Cas9-HF1 of eSPCas9. Door het ontwerp van de gRNA's kunnen mogelijke aspecifieke effecten tijdens gene-editing worden beïnvloed, waarbij voorspellingsprogramma's kunnen helpen om off-target-posities van de gekozen gRNA-sequenties te voorspellen. Ongewenste nadelige effecten kunnen ook worden tegengegaan door de expressie van het Cas-eiwit te reguleren. Bij *in vivo* toepassingen kan dit bijvoorbeeld door het gebruik van weefsel-specifieke promotoren voor de expressie van de CRISPR-Cas-sequenties, of door CRISPR-Cas alleen in een specifiek orgaan zoals het oog toe te dienen en hiermee verdere verspreiding door het lichaam te beperken.^{13,56}

Meestal blijft het vectorgenoom van AAV-vectoren episomaal aanwezig in de celkern, echter in het geval van dubbelstrengsbreuken in het DNA kan het vector-DNA in het genoom integreren.⁴² Bij toepassingen van CRISPR-Cas in AAV-vectoren is een verhoogde integratie van de AAV-vector in het genoom waargenomen door de breuken die door het Cas-eiwit worden aangebracht.^{28,43} De langdurige expressie van het Cas-eiwit die hiervan het gevolg kan zijn, kan leiden tot meer off-target effecten.^{13,41}

Vanwege eerder doorgemaakte bacteriële infecties, kunnen antilichamen tegen het Cas-eiwit in proefpersonen of patiënten aanwezig zijn. Een mogelijke immunoreactie tegen de componenten van CRISPR-Cas heeft implicaties voor de effectiviteit van gene-editing. In een recente studie is gebleken dat een groot deel van de geteste proefpersonen antilichamen had tegen twee veelgebruikte Cas9-eiwitten: in 78% waren antilichamen tegen SaCas9 aanwezig en in 58% tegen SpCas9. Ook konden in een meerderheid van de bloedmonsters T-cellen gericht tegen de Cas-eiwitten worden aangetoond.⁴⁴ Ook in andere studies is de immunogeniteit van het Cas-eiwit beschreven.^{45,46}

1.5 Andere ‘targeted nucleases’

Zoals eerder aangegeven, worden naast CRISPR-Cas ook andere toepassingen onder de ‘targeted nucleases’ geschaard, namelijk de ZFN’s, TALEN’s en de meganucleases. ZFN’s zijn opgebouwd uit 3 tot 6 verschillende DNA-bindende ‘zinc-finger’-motieven gefuseerd aan het endonuclease-domein van het bacteriële FokI restrictie-enzym. Elk ‘zinc-finger’-motief herkent een reeks van 3 nucleotiden. Dimerisatie van de FokI-nuclease is noodzakelijk voor klieving-activiteit. Er worden daarom twee ZFN-constructen gebruikt, die elk een DNA-streng binden in tegengestelde oriëntatie, waarbij dimerisatie tussen de FokI-klievingsdomeinen mogelijk is. De dubbelstrengsbreuk die door FokI aangebracht wordt, heeft een 5’-overhang van 3 nucleotiden. Om de kans op ‘off-target’-effecten te reduceren, worden ook wel ZFN’s gebruikt met specifieke FokI-domeinen die obligate heterodimeren vormen.^{47,48} Ook kunnen additionele ‘zinc-finger’-motieven toegevoegd worden en wordt onderzoek gedaan om de specificiteit van de zinc-fingers te verhogen.^{49,50} Omdat ZFN’s relatief klein zijn, kunnen deze via diverse methoden, waaronder AAV-vectoren, overgebracht worden.⁴⁹

Het TALEN-systeem maakt eveneens gebruik van het FokI-endonuclease. FokI is verbonden met ‘transcription activator-like effector’ (TALE)-eiwitdomeinen, die hun oorsprong kennen uit fytopathogene *Xanthomonas*-bacteriën. Ook hier is dimerisatie vereist om een dubbelstrengsbreuk aan te brengen. Het TALE-domein bestaat uit 10 tot 30 herhalingen van 33 tot 35 aminozuren, waarbij de aminozuren op positie 12 en 13 in elke herhaling variëren (‘repeat variable diresidue’ (RVD)). De combinaties van de RVD’s corresponderen één op één met een base in het DNA. De ‘DNA-targeting range’, en daarmee de specificiteit, is voor TALEN’s groter dan die van ZFN’s. Ook zijn er voor TALEN’s relatief weinig ‘off-target’-effecten gerapporteerd.^{51,52} Echter, TALEN’s zijn vaak te groot om door virale vectoren met beperkte capaciteit, zoals AAV-vectoren, overgebracht te worden.⁵³

Meganucleases zijn restrictie-enzymen met lange ‘target-recognition sites’ van 14-40 baseparen. Er wordt onderscheid gemaakt tussen ‘homing-endonucleases’ (HE) die van nature voorkomen in het genoom van bacteriën, archaea, bacteriofagen en in het mitochondriaal- of chloroplastgenoom van eukaryoten (met name planten, algen, schimmels en protozoa), en synthetische meganucleases, die ontwikkeld worden door verschillende HE domeinen uit te wisselen. De meganucleases die het meest

gebruikt worden voor gene-editing betreffen I-SceI en I-CreI. De specificiteit van meganucleases is erg hoog. Net als voor TALENs, worden bij meganucleases weinig off-target effecten gerapporteerd.^{49,54} Het aanpassen van meganucleases voor de herkenning van specifieke nucleotidesequenties is echter complex.⁵⁴ Om dit proces te omzeilen, worden ook wel combinaties van meganucleases en TALENs toegepast, waarbij het TALE-domein gefuseerd wordt aan een meganuclease en een tweede DNA-bindend domein gecreëerd wordt. Deze megaTALs hebben eveneens een hoge specificiteit en lage off-target activiteit.^{49,55}

2. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2019 in een advies een generieke milieuristicobeoordeling 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.⁵⁷ Deze randvoorwaarden zijn in 2020 geüpdatet.⁵⁸ Voor het transgen in AAV-vectoren geldt dat het gebruikte transgen niet codeert voor sequenties die in staat zijn de vector te complementeren of voor schadelijke genproducten of (proto)oncogenen.

De COGEM heeft onlangs voor de eerste keer geadviseerd over een klinische studie met een AAV-vector met sequenties van het CRISPR-Cas9 systeem, ter behandeling van patiënten met een specifieke vorm van netvliesdegeneratie en verlies van het gezichtsvermogen (Leber congenitale amaurosis type 10).⁵⁶ De wijze van toediening van deze vector is door injectie in het oog. De expressie van de CRISPR-Cas9-sequenties, waaronder die van de gRNA's die ontworpen zijn ter reparatie van een sequentie in één van de introns van het CEP290-gen, is onder de controle van een fotoreceptorcel-specifieke promotor. De COGEM achtte de kans dat derden aan de vector blootgesteld zouden worden zeer klein. In het geval derden zouden worden blootgesteld, werden hiervan geen schadelijke effecten verwacht. Om deze redenen was de COGEM van oordeel dat risico's van de toepassing van deze AAV-vector voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

3. Beantwoording van de adviesvraag

Aan de COGEM zijn enkele vragen gesteld over toepassingen met AAV-vectoren waarbij targeted nucleases, zoals CRISPR-Cas9, als transgen worden gebruikt.

Vraag 1a. Is de COGEM van mening dat toepassingen met targeted nucleases, waaronder CRISPR/Cas9 toepassingen, als insert in een AAV-vector voldoen aan de voorwaarden van de generieke milieuristicobeoordeling betreffende AAV vectoren⁵⁷ inclusief de herziene randvoorwaarden⁵⁸ en kunnen deze toepassingen worden afgehandeld onder de VoV procedure voor AAV vectoren⁵⁹, met name dat dit insert wordt beschouwd als een onschadelijk genproduct? De COGEM wordt verzocht haar antwoord toe te lichten.

Vraag 1b. De COGEM wordt verzocht eventuele randvoorwaarden, bijvoorbeeld aan de guide RNAs, de promotor of de insert (zoals het ontstaan van (onbedoelde) gene-drives), voor deze toepassingen aan te geven.

Vraag 2. Is de COGEM van mening dat toekomstige gene-editing toepassingen in combinatie met een AAV-vector ook vallen onder de generieke milieurisicobeoordeling^{57,58} en kunnen worden afgehandeld onder de VoV⁵⁹? De COGEM wordt verzocht om haar antwoord toe te lichten en een eventuele afbakening te duiden.

In onderstaande paragrafen zal ingegaan worden op de verschillende (deel)vragen.

3.1 Targeted nucleases als (on)schadelijk genproduct

Als voorwaarde voor het insert in de generieke milieurisicobeoordeling voor klinische studies met AAV-vectoren^{57,58} geldt dat het gebruikte transgen niet codeert voor sequenties die in staat zijn de vector te complementeren, of voor schadelijke genproducten of (proto)oncogenen. Nucleases spelen een belangrijke rol bij o.a. de reparatie van het DNA wanneer schade optreedt, en worden op zichzelf niet als schadelijke genproducten beschouwd. Bij gene-editing door ‘targeted nucleases’ kunnen enkelstrengs- of dubbelstrengsbreuken op specifieke plaatsen in het DNA aangebracht worden. Deze breuken kunnen leiden tot ongewenste en potentieel schadelijke effecten bij proefpersonen of patiënten, zoals beschreven in de paragraaf over ongewenste on- en off-target effecten (paragraaf 1.4).

Op verschillende manieren kan ervoor gezorgd worden dat toepassingen met targeted nucleases minder leiden tot ongewenste effecten. Zo kan bij toepassingen van CRISPR-Cas onder andere de expressie van het Cas-eiwit en de gRNA’s gereguleerd worden door gebruik van weefsel-specifieke promotoren, of kan de toepassing veiliger worden door gebruik te maken van ‘high-fidelity’ Cas-eiwitten met een verhoogde specificiteit. Ook aanpassingen in de gRNA’s kunnen zorgdragen voor verhoogde specificiteit op de gewenste positie in het DNA. Hoewel veel onderzoek plaatsvindt om de kans op deze ongewenste effecten te verminderen, kunnen deze risico’s vooralsnog niet generiek uitgesloten worden. De kans op deze ongewenste effecten neemt tevens toe wanneer de sequenties van de targeted nucleases langdurig tot expressie komen. Dit is het geval bij de *in vivo* toepassing met AAV-vectoren waarbij het AAV-vectorgenoom episomaal of na integratie als gevolg van de dubbelstrengsbreuk door het nuclease in de celkern aanwezig blijft.

In geval van blootstelling van een derde aan de AAV-vector, kan niet op voorhand generiek worden gesteld dat de beoogde modificatie door CRISPR-Cas, of een andere targeted nuclease, op de aangegeven positie (on-target modificatie), dan wel een niet-beoogde modificatie (ongewenst effect) op een on-target of off-target positie, onschadelijk is. Daarnaast kan blootstelling leiden tot ongewenste integratie van AAV-vectorsequenties in het genoom van derden. Dit zou leiden tot langdurige expressie van het nuclease in de derde, maar zou ook de verstoring (inactivatie) van een tumorsuppressorgen of tot activatie van een proto-oncogen tot gevolg kunnen hebben.

Gezien het bovenstaande is de COGEM van oordeel dat de vraag of targeted nucleases als schadelijke genproducten beschouwd dienen te worden, niet eenduidig te beantwoorden is. De mate waarin potentiële ongewenste of schadelijke effecten (on- of off-target effecten en integratie van vectorsequenties) optreden, is onder meer afhankelijk van het specifieke construct, gecombineerd met

de specificiteit van de gRNA's of het DNA-bindend domein van de targeted nucleases anders dan CRISPR-Cas.

3.2 Blootstelling van derden aan AAV-vectoren met targeted nucleases

Hoewel eventuele ongewenste effecten van gene-editing bij *in vivo* toepassingen van targeted nucleases in AAV-vectoren in de eerste plaats een risico voor de patiënt of proefpersoon vormen, kunnen AAV-vectoren uitgescheiden worden via bijvoorbeeld speeksel, bloed, feces, semen en urine^{60,61} en om deze reden kan niet bij alle toepassingen uitgesloten worden dat derden blootgesteld kunnen worden aan de AAV-vector.⁵⁷ De mate van uitscheiding, en daarmee mogelijke blootstelling aan derden, is afhankelijk van de toedieningsroute en de gebruikte vector.⁶² Bij intraveneuze toediening bereikt de concentratie uitgescheiden vector-DNA meestal een piek binnen één week na toediening. Het tijdstip waarop er geen vector-DNA meer aangetoond kan worden in excreties, varieert tussen studies. In een enkele studie is tot 52 weken na toediening nog vector-DNA aangetroffen in sperma, speeksel en feces.⁶³ De COGEM plaatst hierbij de kanttekening dat uitscheiding van AAV-vectoren in lichaamsvloeistoffen in vrijwel alle studies wordt geanalyseerd door middel van PCR; aanwezigheid van vector-DNA hoeft niet te betekenen dat er daadwerkelijke infectieuze vectordeeltjes aanwezig zijn. In enkele dierstudies is onderzoek gedaan naar de uitscheiding van infectieuze vectordeeltjes. Deze zijn aangetroffen in ontlasting van schapen⁶⁴ en in bloed van makaken,⁶⁵ in beide gevallen tot 48 uur na toediening van de AAV-vectoren. Gegevens over de uitscheiding van infectieuze vectordeeltjes bij deelnemers aan klinische studies zijn, voor zover bij de COGEM bekend, niet beschikbaar.

De COGEM merkt op dat de blootstelling van derden aan AAV-vectoren aanzienlijk minder vectordeeltjes zal betreffen dan waar de patiënt of proefpersoon aan blootgesteld wordt. Desondanks kan niet generiek uitgesloten worden dat er blootstelling en mogelijk transductie op kan treden in derden, waarbij zich ongewenste effecten kunnen voordoen. Hierbij dient opgemerkt te worden dat verdere verspreiding door het replicatie-deficiënte karakter van de AAV-vector uitgesloten is.

3.3. Voorkomen ongewenste effecten bij derden

Teneinde de kans op onbedoelde blootstelling van derden aan AAV-vectoren met targeted nucleases tot een minimum te beperken, adviseert de COGEM aanvullende hygiënemaatregelen op te nemen boven de eerder geadviseerde randvoorwaarden voor de toepassing van AAV-vectoren in klinische studies. Aangezien de mate, de route en de duur van uitscheiding kunnen variëren, en onder andere afhankelijk zijn van de toedieningswijze en de te gebruiken vector, adviseert zij uit voorzorg de volgende generieke maatregelen te hanteren:

- Gedurende de opname in het ziekenhuis adviseert de COGEM maatregelen te hanteren overeenkomstig met de maatregelen die zijn opgenomen in de WIP-richtlijn Gentherapie (met name hoofdstuk 7: isolatiemaatregelen na toediening), zoals gepubliceerd in 2011;⁶⁶
- Met betrekking tot mogelijke blootstelling via urine en feces adviseert de COGEM het gebruik van een eigen toilet (waar geen anderen gebruik van mogen maken) gedurende 2 weken na toediening, en/of gecombineerd met inactivatie door een chlooroplossing;

- Met betrekking tot mogelijke blootstelling via speeksel en sperma adviseert de COGEM gedurende 2 weken na toediening effectieve contraceptie in de vorm van een fysiek barrièremiddel, zoals een condoom, in acht te nemen en speekseluitwisseling te voorkomen;
- Met betrekking tot blootstelling via bloed adviseert de COGEM dat contact met bloed vermeden moet worden gedurende 2 weken na toediening, en dat er hygiëne-instructies gegeven dienen te worden aan patiënt en derden als familieleden over het gebruik van pleisters, maandverband en tampons, en dat handen gewassen moeten worden na het verwijderen ervan.

Deze maatregelen sluiten aan bij de maatregelen die genomen worden bij patiënten met specifieke infectieziekten, zoals Zika, om verdere verspreiding te voorkomen. De COGEM merkt op dat afgeweken kan worden van deze maatregelen, indien de aanvrager voor de betreffende toepassing hier een goede onderbouwing voor kan aanleveren. Zo kan bij toedieningswijzen waarbij verdere verspreiding in het lichaam beperkt of uitgesloten is (zoals bij toediening in het oog^{56,67}), volstaan worden met kortdurende en/of andere beheersmaatregelen.

3.4 Kiembaanmodificatie

In vraag 1b wordt verwezen naar het ontstaan van (onbedoelde) gene-drives. Voor het ontstaan van een gene-drive is het noodzakelijk dat integratie van het CRISPR-Cas-construct in het genoom van kiembaancellen optreedt. De COGEM signaleert dat AAV-vectoren met CRISPR-Cas sequenties, of sequenties van andere targeted nucleases, een verhoogde kans hebben op integratie van het genoom.^{42,43} Wanneer integratie van het vectorgenoom in de kiembaancellen optreedt, is er sprake van kiembaanmodificatie, wat bij wet verboden is in Nederland. Er zijn geen aanwijzingen dat bij toepassingen van AAV-CRISPR kiembaantransmissie plaatsvindt wanneer de vector niet in de gonaden wordt toegediend. Wel is het aantal preklinische studies met AAV-vectoren met targeted nucleases waarin gekeken is naar kiembaantransmissie, zeer beperkt. In een dierstudie waarbij een AAV2/8-vector met CRISPR-Cas9-sequenties intraveneus toegediend is in een muismodel voor fenylylketonurie (PKU), zijn uit een koppel genetisch-gecorrigeerde muizen geen genetisch-gecorrigeerde nakomelingen geboren, hetgeen erop wijst dat er geen kiembaantransmissie heeft plaatsgevonden.⁶⁸

Gezien de verhoogde kans op integratie van (delen van) het AAV-vectorgenoom bij gebruik van targeted nucleases, adviseert de COGEM dat AAV-vectoren met CRISPR-Cas, of andere targeted nucleases, niet toegediend mogen worden in de gonaden van deelnemers aan klinische studies.

3.5 Toekomstige gene-editing toepassingen

De COGEM is van oordeel dat ook toekomstige gene-editing toepassingen in combinatie met een AAV-vector op dezelfde manier beoordeeld kunnen worden, mits deze toekomstige toepassingen een vergelijkbare werking hebben als de huidige bekende systemen zoals beschreven in paragraaf 1.2, en met de aanvullende generieke maatregelen genoemd in paragraaf 3.3. Onder toepassingen met een vergelijkbare werking verstaat de COGEM verschillende Cas-eiwitten die op eenzelfde wijze breuken in het DNA induceren en geoptimaliseerde Cas-systemen, waaronder prime- en base-editing systemen.

4. Conclusie

Concluderend is de COGEM van oordeel dat niet generiek op voorhand uitgesloten kan worden dat AAV-vectoren met CRISPR-Cas of andere targeted nucleases als insert, ongewenste on- en off-target effecten kunnen veroorzaken. Omdat de vectoren na toediening aan de patiënt uitgescheiden kunnen worden, kunnen ook derden blootgesteld worden aan de vectoren en mogelijk vergelijkbare ongewenste effecten ervaren. Derhalve adviseert de COGEM om bij toepassingen van AAV-vectoren met targeted nucleases aanvullende hygiënemaatregelen te hanteren om blootstelling aan derden te beperken. Met inachtneming van de randvoorwaarden zoals beschreven in het generieke advies over AAV-vectoren in klinische studies⁵⁷ en in de update in 2020⁵⁸, en de toepassing van de in dit advies gestelde aanvullende hygiënemaatregelen, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij klinische studies met AAV-vectoren met targeted nucleases verwaarloosbaar klein zijn.

Tevens signaleert de COGEM dat AAV-vectoren met targeted nucleases een verhoogde kans hebben op integratie in het gastheergenoom. Derhalve adviseert de COGEM AAV-vectoren met targeted nucleases niet toe te dienen in de gonaden van deelnemers aan klinische studies.

Referenties

1. Weber ND *et al.* (2014). AAV-mediated delivery of zinc finger nucleases targeting hepatitis B virus inhibits active replication. *PLoS One*. 9: e97579.
2. Ellis BL *et al.* (2013). Zinc-finger nuclease-mediated gene correction using single AAV vector transduction and enhancement by Food and Drug Administration-approved drugs. *Gene Ther.* 20: 35-42
3. Händel EM *et al.* (2012). Versatile and efficient genome editing in human cells by combining zinc-finger nucleases with adeno-associated viral vectors. *Hum. Gene Ther.* 23: 321-329
4. Anguela XM *et al.* (2013). Robust ZFN-mediated genome editing in adult hemophilic mice. *Blood*. 122: 3283–3287
5. Aubert M (2020). Gene editing and elimination of latent herpes simplex virus in vivo. *Nat. Commun.* 11: 4148
6. Wang L *et al.* (2021). Long-term stable reduction of low-density lipoprotein in nonhuman primates following in vivo genome editing of PCSK9. *Mol. Ther.* 29: 2019-2029
7. Jinek M *et al.* (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337:816-821
8. ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/>. Bezocht 13 januari 2022
9. Chang H *et al.* (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 18: 495-506
10. Olson EN (2021). Toward the correction of muscular dystrophy by gene editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 118: e2004840117. doi: 10.1073/pnas.2004840117
11. 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

12. Ranjha L *et al.* (2018). Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma* 127: 187–214
13. Broeders M *et al.* (2020). Sharpening the Molecular Scissors: Advances in Gene-Editing Technology. *iScience*. 23, 100789
14. Yan WX *et al.* (2019). Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems. *Science*, 363: 88-91
15. Kleinstiver B *et al.* (2016). High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 529: 490–495
16. Slaymaker IM *et al.* (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 351: 84-88
17. Kim N *et al.* (2020). Prediction of the sequence-specific cleavage activity of Cas9 variants. *Nat. Biotechnol.* 38: 1328-1336
18. Liu JJ *et al.* (2019). CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors. *Nature* 566: 218-223
19. Makarova KS *et al.* (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat. Rev. Microbiol.* 18: 67-83
20. Paul B & Montoya G (2020). CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. *Biomed. J.* 43: 8-17
21. Bayoumi M & Munir M. (2021). Potential Use of CRISPR/Cas13 Machinery in Understanding Virus-Host Interaction. *Front. Microbiol.* 12: 743580
22. Freije CA *et al.* (2019). Programmable inhibition and detection of RNA viruses using Cas13. *Mol. Cell* 76: 826-837
23. Cho SW *et al.* (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* 24: 132-141
24. Hess GT *et al.* (2017). Methods and applications of CRISPR-mediated base editing in eukaryotic genomes. *Mol. Cell* 68: 26-43
25. Gaudelli N *et al.* (2017). Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551: 464-471
26. Anzalone AV *et al.* (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576: 149–157
27. Goell JH & Hilton IB (2021). CRISPR/Cas-based epigenome editing: advances, applications, and clinical utility. *Trends Biotechnol.* 39: 678-691
28. Nelson CE *et al.* (2019). Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Med.* 25: 427-432
29. Zhang Y *et al.* (2021). A consolidated AAV system for single-cut CRISPR correction of a common Duchenne muscular dystrophy mutation. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2021 22: 122-132
30. Wu Z *et al.* (2010) Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol. Ther.* 18: 80-86.
31. Liang SQ *et al.* (2022). AAV5 delivery of CRISPR–Cas9 supports effective genome editing in mouse lung airway. *Mol. Ther.* 30: 238-243
32. Yang Y *et al.* (2016). A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nat. Biotechnol.* 34: 334-338

33. Chew W *et al.* (2016). A multifunctional AAV–CRISPR–Cas9 and its host response. *Nat. Methods* 13: 868–874
34. Truong DJ *et al.* (2015). Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy. *Nucleic Acids Res.* 43: 6450-6458
35. Kim E *et al.* (2017) In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nat. Commun.* 8: 14500
36. Ran FA *et al.* (2015). In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature.* 520: 186-191
37. Fu Y *et al.* (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol* 31: 822-826
38. Hsu PD *et al.* (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31: 827-832.
39. Kosicki M *et al.* (2018). Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat. Biotechnol.* 36: 765-771
40. Kim D *et al.* (2019). Evaluating and enhancing target specificity of gene-editing nucleases and deaminases. *Annu. Rev. Biochem.* 88: 191-220
41. González Castro N *et al.* (2021). Comparison of the Feasibility, Efficiency, and Safety of Genome Editing Technologies. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 10355
42. Deyle DR & Russell DW (2009). Adeno-associated virus vector integration. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 11: 442–447
43. Hanlon KS *et al.* (2019). High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat. Commun.* 10: 4439
44. Charlesworth CT *et al.* (2019). Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat. Med.* 25: 249-254
45. Simhadri VL *et al.* (2018). Prevalence of Pre-existing Antibodies to CRISPR-Associated Nuclease Cas9 in the USA Population. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 10: 105-112
46. Wagner DL *et al.* (2019). High prevalence of *Streptococcus pyogenes* Cas9-reactive T cells within the adult human population. *Nat. Med.* 25: 242-248
47. Miller JC *et al.* (2007) An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.* 25: 778-785
48. Chandrasegaran S (2017). Recent advances in the use of ZFN-mediated gene editing for human gene therapy. *Cell. Gene Ther. Insights.* 3: 33-41
49. Gonzales Castro N *et al.* (2021). Comparison of the Feasibility, Efficiency, and Safety of Genome Editing Technologies. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 10355
50. Gupta A *et al.* (2011). Zinc finger protein-dependent and -independent contributions to the in vivo off-target activity of zinc finger nucleases. *Nucleic Acids Res.* 39: 381-392
51. Zheng N *et al.* (2020). Molecular mechanisms, off-target activities, and clinical potentials of genome editing systems. *Clin. Transl. Med.* 10:412-426
52. Wang X *et al.* (2015). Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. *Nat. Biotechnol.* 33: 175-178
53. Gupta RM & Munsunuru K (2014). Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J. Clin. Invest.* 124: 4154-4161

54. Guha TK & Edgell DR (2017). Applications of Alternative Nucleases in the Age of CRISPR/Cas9. *Int. J. Mol. Sci.* 18: 2565
55. Boissel S *et al.* (2014). megaTALs: a rare-cleaving nuclease architecture for therapeutic genome engineering. *Nucleic Acids Res.* 42: 2591-2601
56. COGEM (2021). 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
57. COGEM (2019). Generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met AAV-vectoren. COGEM advies CGM/190905-01
58. 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
59. Vergunning onder vaste voorschriften conform artikel 39a, 40a, 41a en Bijlage 10 Deel D van de Regeling ggo milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2022-01-01> (Bezocht 3 januari 2022)
60. Tenenbaum L *et al.* (2003). Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr. Gene Ther.* 3: 545-565
61. Reuter JD *et al.* (2012). Assessment of hazard risk associated with the intravenous use of viral vectors in rodents. *Compar. Med.* 62: 361-370
62. Brandon EFA *et al.* (2010). Effect of Administration Route on the Biodistribution and Shedding of Replication-Deficient AAV2: A Qualitative Modelling Approach. *Curr. Gene Ther.* 10: 91-106
63. Rangarajan S *et al.* (2017). AAV5–Factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 377: 2519-2530
64. Farraha M *et al.* (2019). Analysis of recombinant adeno-associated viral vector shedding in sheep following intracoronary delivery. *Gene Ther.* 26: 399-406
65. 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
66. Werkgroep Infectie Preventie (WIP)-richtlijn Gentherapie. <https://www.rivm.nl/documenten/wip-richtlijn-gentherapie> (bezocht: 8 maart 2022)
67. Lin Q *et al.* (2020). Generation of nonhuman primate model of cone dysfunction through in situ AAV-mediated CNGB3 ablation. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 18: 869-879
68. Richards DY *et al.* (2020). AAV-mediated CRISPR/Cas9 gene editing in murine phenylketonuria. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 17: 234-245