

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 29 april 2019
KENMERK CGM/190429-01
ONDERWERP Advies klinische studie met een virale vector ter behandeling van spinale musculaire atrofie

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 18-005_000 met de titel 'Clinical development program for a gene replacement therapy for patients with Spinal Muscular Atrophy utilizing AVXS-101, an adeno-associated viral vector serotype 2/9 containing the human SMN gene' van het Universitair Medisch Centrum Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een klinische studie bij patiënten met spinale musculaire atrofie (SMA). Bij deze patiënten wordt onder meer in de zenuwcellen niet genoeg van het 'Survival Motor Neuron' (SMN) eiwit aangemaakt, of functioneert het eiwit niet goed. Hierdoor kunnen spieren niet meer worden aangezet tot samentrekken en treedt ernstige spierzwakte op. Tijdens de studie wordt een replicatie-deficiënte, genetisch gemodificeerde Adeno-associated virusvector (gg-AAV) in de bloedbaan van patiënten gebracht. In deze vector (AVXS-101) is een gen aanwezig dat codeert voor functioneel SMN. De vector kan de bloed-hersenbarrière passeren. Na passage zal in de motorische zenuwen functioneel SMN eiwit tot expressie komen, wat tot een verbeterde spierfunctie kan leiden.

AVXS-101 is gebaseerd op het apathogene virus AAV, waarbij alle virale genen zijn verwijderd, inclusief de genen die nodig zijn voor replicatie. Bovendien is voor replicatie van AAV ook de aanwezigheid van een helpervirus nodig. Hierdoor kan het gg-AAV wel cellen infecteren, maar zich hierin niet vermenigvuldigen. De COGEM heeft in het verleden verscheidene keren positief geadviseerd over klinische studies waarbij gebruik werd gemaakt van gg-AAV.

De COGEM acht risico's voor mens en milieu bij eventuele uitscheiding van AVXS-101 uit de patiënt verwaarloosbaar klein. Samengevat is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met AVXS-101 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
Voorzitter COGEM

c.c. Dr. J. Westra, Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW
 Dr. D. Horst, Loket Gentherapie

Klinische studie met genetisch gemodificeerd Adeno-associated virus ter behandeling van patiënten met spinale musculaire atrofie

COGEM advies CGM/190429-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag (IM-MV 18-005) voor een klinische fase 3 studie bij patiënten met spinale musculaire atrofie (SMA). Deze patiënten maken door een erfelijke afwijking te weinig van het 'Survival Motor Neuron' (SMN) eiwit aan, waardoor de motorische zenuwcellen in het ruggenmerg en spieren minder goed tot niet functioneren.

Tijdens de voorgenomen studie wordt een replicatiedeficiënte genetisch gemodificeerde (gg) op Adeno-associated virus (AAV) gebaseerde vector intraveneus aan patiënten met SMA toegediend. De virale vector (AVXS-101) bevat een expressiecassette met een functioneel gen coderend voor humaan SMN. Naar verwachting zullen na toediening van AVXS-101 motorische zenuwcellen door de vector getransduceerd worden, waardoor deze het SMN eiwit tot expressie brengen en functieherstel van de motorische neuronen en spieren optreedt. Het doel van de studie is de veiligheid en werkzaamheid van een eenmalige dosis van AVXS-101 bij patiënten met SMA te testen.

1.1 Spinale musculaire atrofie (SMA)

SMA wordt autosomaal recessief overgedragen, is een betrekkelijk zeldzaam ziektebeeld, en kent afhankelijk van de hoeveelheid aangemaakt SMN eiwit - verschillende gradaties.^{1,2} Indien er onvoldoende van het SMN eiwit aanwezig is, overleven de motorische zenuwen in het ruggenmerg minder goed. Hierdoor worden er gebrekkige of geen signalen naar de spieren doorgegeven, worden deze minder goed tot samentrekken aangezet, treden verlammingen op, en neemt de spiermassa af.¹ Hoe minder van het SMN eiwit aanwezig is, des te jonger is de leeftijd waarop de ziekte SMA zich openbaart en des te ernstiger is het ziekteverloop. Bij de meest ernstige vorm openbaart de ziekte zich al tijdens de zwangerschap of overlijden patiënten ruim voor het tweede levensjaar (SMA type 0 en type 1).²

Het SMN eiwit komt in alle cellen van het lichaam voor en wordt primair gecodeerd door het *SMN1* gen.^{2,3} Het gen kan in meerdere kopieën aanwezig zijn. Eén functioneel *SMN1* gen is voldoende om te voorkomen dat zich SMA ontwikkelt. Ongeveer 13% van de mensen brengt drie kopieën van het *SMN1* gen tot expressie en bijna 1% van de populatie vier kopieën.^{4,5}

Op hetzelfde chromosoom is op een andere locatie ook een *SMN2* gen aanwezig. Dit is - met uitzondering van één puntmutatie - identiek aan het *SMN1* gen.² Ten gevolge van deze mutatie brengt het *SMN2* gen ten opzichte van het *SMN1* gen 10 tot 15% van de hoeveelheid van het SMN eiwit tot expressie.² Ook het *SMN2* gen kan in meerdere kopieën aanwezig zijn.

Indien beide allelen van het *SMN1* gen vanwege een deletie of mutatie disfunctioneel zijn, kan het *SMN2* genproduct het SMA ziektebeeld enigszins compenseren. Hoe meer kopieën van het *SMN2* gen aanwezig zijn, des te langzamer verloopt het degeneratieve neuromusculaire proces. Indien een SMA patiënt vier of meer kopieën van het *SMN2* gen bezit, kan deze de volwassen leeftijd bereiken en nemen spierfuncties langzaam af.²

1.2 Adeno-associated virus

Adeno-associated virussen (AAV's) behoren tot de familie *Parvoviridae* en zijn onder verschillende soorten binnen het genus *Dependoparvovirus* ondergebracht.⁶ Er bestaan diverse AAV serotypes, die onder meer verschillen in gastheerspecificiteit en weefsel tropisme.^{7,8} *Adeno-associated dependoparvovirus A* is de typesoort van het genus *Dependoparvovirus*, en omvat de serotypes AAV-1 tot en met AAV-4, AAV-6 tot en met AAV-13, en AAV-S17.⁶

AAV's zijn enkelstrengs DNA-virussen met een genoom van circa 5 kilobasen (kb).⁸ In het genoom bevinden zich twee genen: *rep* en *cap*. Het *rep* gen codeert voor de vier replicase-eiwitten (Rep) die een rol spelen bij de virusreplicatie, de expressie van de structurele eiwitten, en de integratie van het virusgenoom in het genoom van de gastheer. Het *cap* gen codeert voor de drie capsid-eiwitten (VP1, VP2 en VP3) die het genoom omhullen.⁸ Daarnaast bevindt zich binnen het *cap* gen 'nested' een alternatief 'open reading frame' (ORF) dat codeert voor het 'assembly activating protein' (AAP).^{9,10} Van AAP wordt verondersteld dat het een rol speelt bij de assemblage van het capsid.

De *rep* en *cap* genen worden geflankeerd door twee 'inverted terminal repeats' (ITR's). Deze fungeren als start van de DNA-replicatie en als het 'packaging' signaal (inpakken van het virale genoom in de capsid-eiwitten). Daarnaast zijn zij betrokken bij de integratie van het virale DNA in het chromosoom van de gastheer.¹¹

AAV is replicatiedeficiënt. Voor efficiënte replicatie is co-infectie met een helpervirus nodig, zoals een adenovirus of een herpesvirus.^{8,11} Als er geen ander virus in de cel aanwezig is, blijft AAV latent intra- of extrachromosomaal in de celkern aanwezig in afwachting van infectie door een helpervirus.^{9,11,12,13} Integratie van het AAV genoom in het chromosoom is locatie-specifiek, en vindt meestal plaats in de lange (q) arm van chromosoom 19 ter hoogte van de AAVS1 site.^{12,14} Bij ongeveer 0,1% van de AAV-2 virusdeeltjes treedt integratie in het gastheergenoom op.^{15,16}

AAV kan verschillende warmbloedige dieren, inclusief de mens, infecteren.¹¹ Infecties met AAV komen wereldwijd en frequent voor (80% van de humane populatie is seropositief voor AAV-2), maar gaan voor zover bekend niet gepaard met ziekteverschijnselen.¹⁷ Overdracht van het virus vindt waarschijnlijk plaats via de respiratoire of gastro-intestinale route.⁸ De COGEM heeft in 2018 de pathogeniteitsklasse-indeling van *Adeno-associated dependoparvovirus A* heroverwogen en het virus als niet-ziekteverwekkend ingedeeld in de laagste pathogeniteitsklasse.¹⁸

1.3 Gg-AAV vector AVXS-101

Tijdens deze klinische studie wordt gebruik gemaakt van een 'self-complementary' (sc) gg-AAV vector gebaseerd op AAV-2 en AAV-9.

In de vector zijn de genen die coderen voor de Rep en capsid-eiwitten vervangen door een expressiecassette met cDNA dat codeert voor het ontbrekende SMN eiwit. Het *SMN* gen wordt voorafgegaan door een cytomegalovirus (CMV) 'enhancer/chicken β -actin (CB)-hybrid' promotor, het Simian virus 40 (SV40) intron, humaan *SMN* cDNA, en een 'bovine' groeihormoon polyadenylerings terminatiesequentie (BGH polyA). De expressiecassette wordt geflankeerd door ITR-sequenties afkomstig van AAV-2. In de 'linker' ITR zijn mutaties aangebracht, waardoor er in de productiecellijn door middel van 'hairpin' vorming en 'self-annealing' een dubbelstrengs DNA-molecuul gevormd

wordt.¹⁹ Hierdoor vindt er in de lichaamscellen een snellere transcriptie van het transgen en productie van SMN plaats.

Voor de productie van AVXS-101 wordt gebruik gemaakt van drie plasmiden. Het ‘transgen plasmide’ (pSMN) bevat de transgene SMN expressiecassette geflankeerd door de AAV-2 ITR’s. Een adenovirus (AdV) helperplasmide (pHELP) codeert voor de helpervirus eiwitten E2A, E4 en het ‘viral associated’ (VA) RNA. Het AAV2/9 helperplasmide(pAAV) levert *in trans* de AAV-2 Rep en de AAV-9 VP1-, VP2- en VP3-eiwitten aan. Hierdoor wordt de vector omhuld met het manteleiwit van AAV-9 en ontstaat een AAV2/9 gepseudotypeerd virusdeeltje. De keuze voor het AAV-9 capsid is ingegeven door het feit dat dit serotype de bloed-hersenbarrière kan passeren waardoor de gg-vector de zenuwcellen kan bereiken.²⁰ AVXS-101 wordt geproduceerd door de genoemde plasmiden te co-transfecteren in HEK293 cellen (een humane embryonale niercellijn). Deze HEK293 cellen brengen de E1A en E1B genen van humaan AdV type 5 constitutief tot expressie, wat eveneens nodig is voor de productie van de gg-AAV vector. De productie van de vector vindt elders plaats en maakt geen deel uit van de onderhavige vergunningaanvraag.

2. Eerdere COGEM adviezen over klinische studies met gg-AAV vectoren

Sinds 2005 heeft de COGEM acht keer adviezen uitgebracht over de mogelijke risico’s voor mens en milieu van klinische studies met gg-AAV vectoren.^{21,22,23,24,25,26,27,28} De COGEM achtte in alle gevallen de risico’s voor mens en milieu verwaarloosbaar klein. De COGEM adviseerde enkele aanvullende voorschriften te hanteren, of stemde in met de voorgestelde voorschriften van de aanvrager. Het betrof de volgende voorschriften:

- Patiënten nemen - in combinatie met een barrièremiddel - effectieve anticonceptie in acht gedurende de door de aanvrager aangegeven periode;
- De vector zal niet toegepast worden wanneer er klinische aanwijzingen zijn voor een actieve virale infectie;
- De behandelde patiënten worden uitgesloten van donatie van bloed, cellen en weefsels.

In haar laatste adviezen van 2018 merkte de COGEM op dat zij de kans op kiembaantransmissie van gg-AAV vectoren verwaarloosbaar klein acht. Zij stemde in met het voorschrift van de aanvrager om effectieve conceptie in de vorm van een barrièremiddel in acht te nemen, teneinde de kans op onnodige blootstelling van derden aan de gg-vector te minimaliseren.^{27,28}

Tevens plaatst de COGEM sinds 2018 bij haar adviezen een kanttekening bij het voorschrift over het niet toepassen van de gg-AAV vector als er klinische aanwijzingen zijn voor een actieve virale infectie.^{24,27,28} Zij is van oordeel dat dit voorschrift uit milieurisico-overwegingen niet noodzakelijk is, omdat de kans verwaarloosbaar klein is dat na toediening van de gg-AAV vector een drievoudige infectie van één cel kan optreden met de gg-AAV vector, wild-type AAV en helpervirus. Daardoor is de kans ook verwaarloosbaar klein dat de gg-AAV vector verder verspreid kan worden. Deze inschatting wordt ondersteund door het feit dat er in de natuur tijdens AAV-infecties nog nooit defectieve AAV-deeltjes zijn waargenomen, hetgeen een aanwijzing is dat deficiënte vectorsequenties niet gecompenseerd en ingepakt zullen worden door wild-type AAV.

Het voorschrift over de donatie van bloed, cellen en weefsels werd bij de studies met hemofilie- en reumapatiënten niet geadviseerd, omdat deze patiënten hiervan al uitgesloten zijn.^{23,24,25,28}

3. Informatie over de klinische studie

De klinische studie zal plaatsvinden in het Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMCU). Tijdens deze studie ontvangen maximaal 500 patiënten éénmalig een dosis AVXS-101 van $1,1 \times 10^{14}$ vectorgenomen per kilogram (vg/kg). Alleen patiënten met een bevestigde diagnose voor SMA (een deletie of puntmutaties in beide *SMN1* genen) worden geïnccludeerd. De vector wordt toegediend via een intraveneuze katheter in een perifere ader.

De infuuszak met de gg-vector wordt in een veiligheidskabinet van klasse II voorbereid. Tijdens de bereiding dragen de medewerkers beschermende kleding en handschoenen. Daarna wordt de infuuszak in een gesloten container naar de kamer van de patiënt gebracht waar de vector zal worden toegediend. Tijdens de toediening draagt het medisch personeel beschermende kleding en handschoenen. Indien er vloeistof gemorst wordt, wordt dit eerst met een chlooroplossing (1000 ppm) gedecontamineerd en vervolgens met 70% ethanol schoongemaakt. De container waarin de infuuszak is vervoerd en de containers met besmet afval worden, voordat deze de toedieningsruimte verlaten, aan de buitenzijde met 70% ethanol gedecontamineerd.

De patiënten blijven na toediening 24 tot 48 uur in het ziekenhuis. Tot 4 weken na toediening zullen op verschillende tijdstippen urine, speeksel en feces met behulp van een 'digital droplet' PCR (ddPCR) geanalyseerd worden op de aanwezigheid van vector DNA. De detectielimieten van de analyses bedragen $1,1 \times 10^5$ vg/mL urine of speeksel, en $1,1 \times 10^6$ vg/g feces.

Zorgverleners en familieleden zullen instructies krijgen over het in acht nemen van een goede handhygiëne (zoals regelmatig de handen met zeep wassen) tot 4 weken na toediening van de gg-vector. Indien tijdens het ziekenhuisverblijf bloed, speeksel, urine of feces monsters worden afgenomen, zal het behandelend personeel handschoenen en beschermende kleding dragen. In de thuissituatie zullen familie en zorgverleners handschoenen dragen wanneer ze in contact kunnen komen met lichaamsvloeistof of ontlasting. Afval, zoals vuile luiers en gebruikte handschoenen, worden in dubbele afvalzakken via het huishoudelijk afval afgevoerd.

De aanvrager geeft aan dat na het ontvangen van de gentherapie patiënten zijn uitgesloten van het doneren van organen, weefsels of bloed.

4. Overweging

In de onderhavige aanvraag wordt de replicatiedeficiënte vector AVXS-101 toegediend aan patiënten met SMA. Mogelijke risico's die hierbij kunnen optreden, hebben betrekking op de pathogeniteit van het gg-organisme (ggo), de mogelijke verspreiding van het ggo in het milieu, en de eventuele vorming van nieuwe recombinante virussen. Door verspreiding zouden andere personen dan de deelnemende patiënten geïnfecteerd kunnen worden met het ggo of met een recombinant virus.

4.1 Moleculaire karakterisering

Gg-vector AVXS-101 is geproduceerd door middel van co-transfectie van cellijn HEK293 met drie

verschillende plasmiden: pSMN, pAAV en pHELP. Het genoom van de gg-vector bestaat uit een expressiecassette die codeert voor SMN, en wordt geflankeerd door ITR-sequenties afkomstig van AAV-2. Het vectorgenoom wordt omhuld door de capside-eiwitten van AAV-9.

De aanvrager heeft de genoomsequentie van AVXS-101 overlegd en deze vergeleken met de sequentie in 'transgen plasmide' pSMN. Tevens is de sequentie in plasmide pAAV, die codeert voor de AAV-9 capside-eiwitten, vergeleken met de referentiesequentie. De aanvrager meldt dat beide sequenties overeenkomen met de referentiesequenties. Op basis van deze genotypische karakterisering, is de COGEM van oordeel dat AVXS-101 voldoende moleculair gekarakteriseerd is.

4.2 Pathogeniteit

De virale vector AVXS-101 is gebaseerd op het niet pathogene oudervirus *Adeno-associated dependoparvovirus A*. Dit virus kan, zoals alle AAV's, alleen repliceren in de aanwezigheid van een helpervirus.^{8,11} De vector bevat de ITR's van wild-type AAV-2, waarbij één ITR gemodificeerd is. De ITR's zijn nodig voor het inpakken van het genetische materiaal in het vectordeeltje. De *rep* en *cap* sequenties zijn uit het virus verwijderd. Door het ontbreken van de Rep- en capside-eiwitten kan AVXS-101 zich ook in aanwezigheid van een helpervirus niet meer repliceren. Tevens is de kans op integratie in chromosoom 19 door het ontbreken van de Rep-eiwitten verwaarloosbaar klein.

De bovenstaande argumenten in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat AVXS-101 geattenuëerd en biologisch ingeperkt is, en niet in staat is zich in het milieu te verspreiden.

Het door de gg-vector tot expressie gebrachte SMN eiwit is lichaamseigen. De bij gezonde individuen aanwezige hoeveelheid SMN eiwit is afhankelijk van het aantal genkopieën in het genoom en daardoor variabel. Deze variatie brengt geen toxische verschijnselen met zich mee en is niet geassocieerd met pathologie.

De aanvrager geeft aan dat een studie met transgene muizen waarbij SMN in overmaat tot expressie werd gebracht, geen schadelijke effecten liet zien.²⁹ Tevens wijst de aanvrager op een in de literatuur beschreven studie, waarbij aan vier muizen 5×10^{11} vg van AVXS-101 werden toegediend. Er werd een verbetering in de overleving en de motorische functies waargenomen, maar pathologische verschijnselen of toxiciteit werden niet waargenomen.³⁰ De aanvrager meldt dat er tijdens een toxiciteitsstudie bij muizen mortaliteit optrad bij een dosis van $\geq 2,4 \times 10^{14}$ vg/kg. Op basis van deze studie is de maximale verdraagbare dosis AVXS-101 vastgesteld op $1,5 \times 10^{14}$ vg/kg.

Een recent uitgevoerde klinische fase 1 studie met AVXS-101 bij 15 patiënten met SMA type 1 (een deletie of puntmutaties in beide *SMN1* genen en 2 kopieën van *SMN2* gen in het genoom aanwezig) waarbij doses van $6,7 \times 10^{13}$ vg/kg en $2,0 \times 10^{14}$ vg/kg werden toegediend, liet een verbetering in de overleving en de motorische functies zien (klinische studie AVXS-101-CL-101; Mendell *et al.* (2017)).³¹ Tijdens deze studie was het enige 'serious adverse event' waarvoor behandeling noodzakelijk was, een verhoogd gehalte aan lever-aminotransferases in de bloedbaan (vier patiënten). De bijwerking kon door middel van behandeling met prednisolon worden verholpen en er werden geen leverafwijkingen geconstateerd.

Zeer recent is bij een lopende klinische fase 3 studie het overlijden van een patiënt (baby) gemeld, waarbij niet uitgesloten kan worden dat de toediening van AVXS-101 hier mogelijk aan bijgedragen heeft.^{32,33,34,35} De beschikbare informatie is op dit moment summier en heeft nog niet geleid tot een conclusie.

De COGEM merkt op dat SMA een complex ziektebeeld betreft met een hoge mortaliteit. Zij kan niet uitsluiten dat het toepassen van de gg-vector bij patiënten, die al in een slechte conditie verkeren, tot ernstige neveneffecten kan leiden. Zij heeft vooralsnog geen redenen om aan te nemen dat het droevige feit van het overlijden van de baby wijst op een verhoogd milieurisico van AVXS-101.

4.3 Recombinatie en complementatie

Tijdens het productieproces van AVXS-101 of na toediening van AVXS-101 aan de patiënt zouden door recombinatie 'replicatiecompetent' AAV (rcAAV),^a of door complementatie gg-AAV-vectordeeltjes met productiesysteem-gerelateerde sequenties of gastheercelsequenties kunnen ontstaan.

4.3.1 Recombinatie tijdens het productieproces

Bij de productie van AVXS-101 is gebruik gemaakt van een drie-plasmiden productiesysteem zonder dat daarbij helpervirus aanwezig was. Dit systeem is al sinds 1998 in gebruik.³⁶ De aanvrager geeft aan dat de kans dat er bij dit systeem door middel van recombinatie 'replicatiecompetent' AAV (rcAAV)^a ontstaat, verwaarloosbaar klein is. Tevens stelt de aanvrager dat de vectorbatch aan de hand van *in vitro* assays op cellijnen gecontroleerd is op de afwezigheid van viruscontaminatie.

De COGEM is het met de aanvrager eens dat de kans op aanwezigheid van rcAAV in de vectorbatch verwaarloosbaar klein is bij gebruik van het genoemde drie plasmiden systeem, mede gezien het feit dat de batch gecontroleerd is op de afwezigheid van viruscontaminatie. De COGEM merkt op dat, als theoretisch gezien recombinatie tussen sequenties van het Rep2/Cap9 pAAV helperplasmide en vectorsequenties van het pSMN plasmide zou leiden tot rcAAV, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn, omdat er door de recombinatie geen transgen meer in het rcAAV aanwezig is. Het rcAAV virus zou in dat geval vergelijkbaar zijn met apathogeen wild-type AAV.

4.3.2 Aanwezigheid van niet-vector gerelateerde sequenties

Na de productie van de AAV vector kunnen er lage hoeveelheden plasmide DNA of gastheercel DNA-sequenties in het eindproduct aanwezig zijn. De COGEM merkt op dat het een bekend fenomeen is dat bij de productie van recombinante AAV vectoren een lage hoeveelheid niet-virusvector gerelateerde sequenties ingepakt worden in vectordeeltjes (1:100 tot 1:1000 gg-AAV vectordeeltjes).³⁷ Zij is van oordeel dat deze heterologe sequenties niet leiden tot risico's voor mens en milieu, omdat zij geen selectief voordeel opleveren en zich niet verder kunnen verspreiden.

^a De term 'replicatiecompetent' AAV wordt gebruikt om aan te geven dat het gelijk is aan wildtype AAV. In feite kan AAV op zichzelf echter niet repliceren.

4.3.3 Recombinatie en complementatie in de patiënt

Na toediening van het ggo aan de patiënt, kan er theoretisch in aanwezigheid van wild-type AAV en helpervirus homologe recombinatie of complementatie optreden. Bij recombinatie tussen de ITR's van de vector en wild-type AAV kunnen de *rep* en *cap* sequenties van het wild-type AAV uitgewisseld worden met de SMN expressiecassette van het ggo. In deze situatie ontstaat wederom het ggo, of virus dat nagenoeg gelijk is aan het wild-type AAV (pathogeniteitsklasse 1). De COGEM acht het risico van homologe recombinatie met wild-type AAV daarom verwaarloosbaar klein.

Door complementatie kunnen er in theorie in de patiënt opnieuw AVXS-101 deeltjes worden gevormd. Echter, de kans dat er in een zelfde cel zowel AVXS-101, wild-type AAV en een helpervirus aanwezig zijn, acht de COGEM verwaarloosbaar klein. Indien er toch complementatie optreedt en er een recombinant AAV virusdeeltje gevormd wordt, zal dit nog steeds replicatiedeficiënt zijn. De COGEM acht het risico ten gevolge van complementatie daarom verwaarloosbaar klein.

4.4 Uitscheiding

Tijdens de voorgenomen studie blijven behandelde patiënten minimaal 24 uur in het ziekenhuis. Het ggo kan in het ziekenhuis, in de thuissituatie of elders in het milieu worden uitgescheiden.

In de literatuur is beschreven dat, afhankelijk van de toedieningsroute, gg-AAV vectoren via bloed, feces, semen en urine kunnen worden uitgescheiden.^{38,39} De hoeveelheid uitgescheiden vector is dosis afhankelijk en neemt in de tijd geleidelijk af.^{40,41,42,43} De aanvrager zal tot 4 weken na toediening van de vector feces, speeksel en urine aan de hand van een ddPCR monitoren op de aanwezigheid van vector DNA.

De aanvrager geeft aan dat, tijdens de fase 1 studie met AVXS-101 (AVXS-101-CL-101), tot 18 maanden na toediening feces, speeksel en urine van vijf patiënten aan de hand van een ddPCR gecontroleerd zijn op de aanwezigheid van de gg-vector. Hieruit bleek dat de vector in urine en speeksel één dag na de toediening niet meer detecteerbaar was en het langst aantoonbaar was in feces (maximaal 60 dagen). De aanvrager merkt op dat bij één patiënt na 14 dagen in feces een piekconcentratie van 280% ten opzichte van de toedieningsconcentratie werd gedetecteerd.

De COGEM merkt op dat, wanneer er vector DNA in lichaamsvloeistoffen of weefsels wordt aangetoond, dit niet betekent dat het ook daadwerkelijk infectieus AVXS-101 betreft. Daarnaast merkt zij op dat de kans op de aanwezigheid van een infectieuze gg-AAV-vector in het lichaam verder wordt verkleind op het moment dat de patiënt neutraliserende antilichamen tegen het capsid heeft ontwikkeld.⁴⁰

De COGEM is van oordeel dat de risico's voor mens en milieu ten gevolge van de uitscheiding van AVXS-101 verwaarloosbaar is vanwege het replicatiedeficiënte en apathogene karakter van de gg-vector. Zij stemt in met de voorgenomen hygiënemaatregelen van de aanvrager opdat de kans, dat derden onnodig aan de gg-vector blootgesteld worden, geminimaliseerd wordt.

5. Conclusie

De COGEM is van oordeel dat AVXS-101 afdoende moleculair is gekarakteriseerd. Zij acht de kans verwaarloosbaar klein dat er in de patiënt door recombinatie of complementatie 'rcAAV' of nieuw

AVXS-101 ontstaat. In het theoretische geval dat er toch 'rcAAV' ontstaat, acht zij - gezien het apathogene karakter van het oudervirus - de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

AVXS-101 kan worden uitgescheiden, maar de COGEM acht de risico's voor mens en milieu ten gevolge van eventuele blootstelling aan de gg-vector verwaarloosbaar klein, omdat AVXS-101 niet kan repliceren en daarom niet kan verspreiden.

Samengevat is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen klinische studie met AVXS-101 verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Spierziekten Nederland. Spinale musculaire Atrofie. www.spierziekten.nl/overzicht/spinale-musculaire-atrofie-algemeen (bezocht: 8 april 2019).
2. Kolb SJ *et al.* (2011). Spinal muscular atrophy. *Arch. Neurol.* 68: 979-984
3. Chaytow H *et al.* (2018). The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis. *Cell. Mol. Life. Sci.* 75: 3877-3894
4. Cusin V *et al.* (2003). Prevalence of *SMN1* deletion and duplication in carrier and normal populations: implication for genetic counselling. *J. Med. Genet.* 40: e39
5. Hendrickson BC *et al.* (2009). Differences in *SMN1* allele frequencies among ethnic groups within North America. *J. Med. Genet.* 46: 641-644
6. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 9 april 2019)
7. Zincarelli C *et al.* (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* 16: 1073-1080
8. Tijssen P *et al.* (2012). Family *Parvoviridae*. In: *Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
9. Salganik M *et al.* (2015). Adeno-associated virus as a mammalian DNA vector. *Microbiol. Spectr.* 3: doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0052-2014
10. Sonntag F *et al.* (2010). A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 10220-10225
11. Berns KI & Parrish CR (2013). *Parvoviridae*. In: *Fields Virology, Volume 2, 6th edition*. Edited by Knipe DM en Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
12. Smith RH (2008). Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther.* 15: 817-822
13. Schnepf BC *et al.* (2005). Characterization of Adeno-associated virus genome from human tissue, *J. Virol.* 79:14793-14803
14. Flotte TR & Berns KI (2005). Adeno-associated virus: A ubiquitous commensal of mammals. *Hum. Gene Ther.* 16: 401-407
15. Hüser D *et al.* (2002). Kinetics and frequency of Adeno-associated virus site-specific integration into human chromosome 19 monitored by quantitative real-time PCR. *J. Virol.* 76: 7554-7559

16. McCarty DM *et al.* (2004). Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu. Rev. Genet.* 38: 819-845
17. Gonçalves MA (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology J.* doi:10.1186/1743-422X-2-43
18. COGEM (2018). *Adeno-associated dependoparvovirus A* en *Adeno-associated dependoparvovirus B* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. COGEM advies CGM/180321-01
19. McCarty DM (2008). Self-complementary AAV vectors; Advances and applications. *Mol. Ther.* 16: 1648-1656
20. Foust KD *et al.* (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal-neurons and adult-astrocytes in CNS. *Nat. Biotechnol.* 27: 59-65
21. COGEM (2005). Gentherapie van lipoproteïne lipase (LPL) deficiënte patiënten met een adeno-associated virale vector coderend voor het LPL-eiwit (AMT-010). COGEM advies CGM/050530-01
22. COGEM (2013). Een fase 2b klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met hartfalen. COGEM advies CGM/130603-01
23. COGEM (2015). Een fase I/II klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met een ernstige tot matig ernstige hemofilie B. COGEM advies CGM/150617-01
24. COGEM (2018). Klinische studie met een gg-AAV-FIX variant ter behandeling van patiënten met matige of ernstige hemofilie B. COGEM advies CGM/180625-01
25. COGEM (2016). Klinische studie met genetisch gemodificeerd Adeno-associated virus ter behandeling van patiënten met reumatoïde artritis (LUMC). COGEM advies CGM/160719-02
26. COGEM (2017). Klinische studie met gg-AAV in patiënten met het Crigler-Najjar syndroom. COGEM advies CGM/170821-01
27. COGEM (2018). Klinische studie met genetisch gemodificeerd Adeno-associated virus ter behandeling van patiënten met glycogeenstapelingsziekte type Ia (GSDIa). COGEM advies CGM/181231-02
28. COGEM (2018). Klinische studie met genetisch gemodificeerd Adeno-associated virus ter behandeling van patiënten met ernstige hemofilie A. COGEM advies CGM/181231-03
29. Turner BJ *et al.* (2014). Overexpression of survival motor neuron improves neuromuscular function and motor neuron survival in mutant SOD1 mice. *Neurobiol. Aging* 35: 906-915
30. Foust KD *et al.* (2010). Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat. Biotechnol.* 28: 271-274
31. Mendell JR *et al.* (2017). Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *New Engl. Med.* 377: 1713-1722
32. BioPharma Dive (2019). With FDA decision near, Novartis bolsters SMA gene therapy case. www.biopharmadive.com/news/novartis-zolgensma-sma-strive-data-gene-therapy-patient-deaths/552873/ (bezoekt: 26 april 2019)
33. Reuters (2019). Second death in Novartis gene therapy trials under investigation. www.reuters.com/article/us-novartis-results-zolgensma/novartis-mulling-1-5-mln-5-mln-price-range-for-sma-gene-therapy-idUSKCN1S01O3 (bezoekt: 26 april 2019)

34. SWI swissinfo.ch (2019). Novartis says baby's death may be tied to gene therapy. www.swissinfo.ch/eng/novartis-says-baby-s-death-may-be-tied-to-gene-therapy/44914184 (bezocht: 26 april 2019)
35. FiercePharma (2019). www.fiercepharma.com/pharma/infant-s-death-eu-zolgensma-trial-launches-novartis-internal-probe (bezocht: 26 april 2019)
36. Xiao X *et al.* (1998). Production of high-titer recombinant Adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J. Virol.* 72: 2224-2232
37. Hauck B *et al.* (2009). Undetectable transcription of cap in a clinical AAV vector: implications for performed capsid in immune responses. *Mol. Ther.* 17: 144-152
38. Tenenbaum L *et al.* (2003). Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr. Gene Ther.* 3: 545-565
39. Reuter JD *et al.* (2012). Assessment of hazard risk associated with the intravenous use of viral vectors in rodents. *Compar. Med.* 62: 361-370
40. Nathwani AC *et al.* (2014). Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 371: 1994-2004
41. Natwani AC *et al.* (2011). Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins. *Mol. Ther.* 19: 876-885
42. Wang G *et al.* (2014). Assessment of toxicity and biodistribution of recombinant AAV8 vector-mediated immunomodulatory gene therapy in mice with Pompe disease. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 1:14018 doi: 10.1038/mtm.2014.18. eCollection 2014
43. Favaro P *et al.* (2009). Host and vector-dependent effects on the risk of germline transmission of AAV vectors. *Mol. Ther.* 17: 1022-1030