

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Waterstaat  
Mevrouw drs. S. van Veldhoven-van der Meer  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 31 december 2018  
**KENMERK** CGM/181231-02  
**ONDERWERP** Advies klinische studie met gg-AAV bij patiënten met een  
glycogeenstapelingsziekte

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 18-003\_000 met de titel 'Study of Adeno-Associated Virus (AAV) Serotype 8 (AAV8)-Mediated Gene Transfer of Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) in subjects with Glycogen Storage Disease Type Ia (GSDIa)' van het Universitair Medisch Centrum Groningen, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een klinische studie in patiënten met een glycogeenstapelingsziekte. Deze patiënten hebben een genetisch defect waardoor het G6Pase eiwit, dat betrokken is bij de regulatie van de bloedsuikerspiegel tijdens een nuchtere periode, niet meer geproduceerd wordt. In deze studie wordt een replicatiedeficiënt, genetisch gemodificeerde Adeno-associated virusvector (gg-AAV) in de bloedbaan van patiënten gebracht. Deze zogenaamde DTX401 vector infecteert de lever en brengt hier het G6Pase eiwit tot expressie, dat ervoor zorgt dat de bloedglucosespiegel in balans blijft.

De vector is gebaseerd op het apathogene oudervirus 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 helpvirus nodig. Hierdoor kan het gg-AAV wel cellen infecteren, maar zich hierin niet vermenigvuldigen. De COGEM acht risico's voor mens en milieu bij eventuele uitscheiding van DTX401 uit de patiënt verwaarloosbaar klein.

Samengevat is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met DTX401 verwaarloosbaar klein zijn.



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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

Prof. dr. ing. Sybe Schaap  
Voorzitter COGEM

c.c.           Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo  
                  Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW  
                  Dr. D.A. Bleijs, Loket Gentherapie

# **Klinische studie met genetisch gemodificeerd Adeno-associated virus ter behandeling van patiënten met glycogeenstapelingsziekte type Ia (GSDIa)**

## **COGEM advies CGM/181231-02**

### **1. Inleiding**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag (IM MV 18-003) voor een klinische studie in patiënten met glycogeenstapelingsziekte type Ia (GSDIa). Patiënten met deze stofwisselingsziekte hebben mutaties in het *G6PC* gen, waardoor er een deficiëntie ontstaat van het glucose-6-fosfatase (G6Pase) eiwit. Dit eiwit is betrokken bij de afbraak van glucose-6-fosfaat naar glucose. Afwezigheid van het eiwit kan leiden tot onder meer ernstige hypoglykemie, melkzuurvergiftiging (lactatacidose), epileptische aanvallen, vergrote nieren of lever, en groeiachterstand. In deze studie wordt een replicatiedeficiënte genetisch gemodificeerde Adeno-associated virusvector (gg-AAV) intraveneus aan de patiënten toegediend, waardoor G6Pase tot expressie kan worden gebracht in de lever. Het doel van de klinische studie is om de veiligheid van een eenmalige dosis van de gg-AAV vector bij patiënten met GSDIa te testen. De werkzaamheden voor deze studie zullen uitgevoerd worden in het Beatrix kinderziekenhuis van het Universitair Medisch Centrum Groningen (UMCG).

#### **1.1 Glycogeenstapelingsziekte type Ia (GSDIa)**

GSDIa, ook wel de ziekte van von Gierke genoemd, is een zeldzame (1 op de 100.000 mensen) autosomaal recessieve erfelijke stofwisselingsziekte veroorzaakt door mutaties in het *G6PC* gen gelegen op chromosoom 17q21. Er worden twee varianten van GSDI onderscheiden, namelijk GSDIa, waarbij er een deficiëntie is van het G6Pase enzym, en GSDIb, waarbij de glucose-6-fosfaat transporter niet goed functioneert (veroorzaakt door een mutatie in een ander gen op een ander chromosoom). In ongeveer 80% van alle GSDI gevallen betreft het GSD type Ia.<sup>1</sup> Het G6Pase enzym komt voornamelijk tot expressie in de lever, nier en de darmen.<sup>1,2</sup> Het speelt een rol in de laatste fase van de gluconeogenese, een proces waarbij glucose geproduceerd wordt (bijvoorbeeld uit aminozuren). Een G6Pase deficiëntie heeft tot gevolg dat de bloedglucosespiegel in het bloed niet gereguleerd kan worden, en leidt tot verhoogde concentraties urinezuur, melkzuur en vetten, en lage concentraties glucose in het bloed. Als de ziekte onbehandeld blijft, is deze dodelijk. Door aanpassingen aan het dieet kunnen patiënten met deze ziekte een normale groei en ontwikkeling doormaken, maar blijft continue waakzaamheid nodig. Een ander bijverschijnsel van deze aandoening is het ontstaan van een hepatocellulair adenoom (HCA, een goedaardige tumor welke zich in 75% van de GSDI patiënten ouder dan 25 jaar ontwikkelt), die in 10% van de gevallen kan transformeren in een hepatocellulair carcinoom (een kwaadaardige levertumor).<sup>1,3</sup> Een levertransplantatie kan uitkomst bieden, maar brengt aanzienlijke risico's met zich mee en kan sommige lange-termijn problemen, zoals nierfalen, niet oplossen.<sup>3</sup>

#### **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.<sup>4</sup> Er bestaan diverse AAV serotypes, die

onder meer verschillen in gastheerspecificiteit en weefsel-tropisme.<sup>5,6</sup> *Adeno-associated dependoparvovirus A* is de typesoort van het genus *Dependoparvovirus*, en omvat de types AAV-1 tot en met AAV-4, AAV-6 tot en met AAV-13, en AAV-S17.<sup>4</sup>

AAV's zijn enkelstrengs DNA-virussen met een genoom van circa 5 kb. Op 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 drie capsid-eiwitten (VP1, VP2 en VP3) die het genoom omhullen. Daarnaast bevindt zich binnen het *cap* gen 'nested' een alternatief 'open reading frame' (ORF) dat codeert voor het 'assembly activating protein' (AAP).<sup>7,8</sup> 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.<sup>9</sup>

AAV is replicatiedeficiënt. Voor efficiënte replicatie is co-infectie met een helpervirus nodig, zoals een adenovirus of een herpesvirus.<sup>6,9</sup> 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.<sup>7,9,10</sup> Integratie van het AAV genoom in het chromosoom is locatie-specifiek, en vindt meestal plaats in de lange (q) arm van chromosoom 19 op de AAVS1 site.<sup>10,11</sup> Bij ongeveer 0,1% van de AAV2 deeltjes treedt integratie in het gastheergenoom op.<sup>12,13</sup>

AAV kan verschillende warmbloedige dieren, inclusief de mens, infecteren.<sup>9</sup> 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.<sup>14</sup> Overdracht van het virus vindt waarschijnlijk plaats via de respiratoire of gastro-intestinale route.<sup>6</sup> De COGEM heeft in 2018 *Adeno-associated dependoparvovirus A* als niet-ziekteverwekkend virus ingedeeld in de laagste pathogeniteitsklasse.<sup>15</sup>

### **1.3 Gg-AAV vector DTX401**

In deze klinische studie wordt gebruik gemaakt van een genetisch gemodificeerd organisme (ggo), DTX401, gebaseerd op het Adeno-associated virus serotype 2 en gepseudotyperd met AAV-8 manteleiwitten (AAV-2/8 vector). Voor de constructie van de vector zijn de genen die coderen voor de Rep en Cap eiwitten vervangen door een expressiecassette met het humane *G6PC* cDNA (codon-geoptimaliseerd) dat codeert voor het G6Pase enzym, en is de vector replicatiedeficiënt. De expressiecassette wordt geflankeerd door de ITR sequenties afkomstig van AAV-2. In de vector staat de expressie van G6Pase onder transcriptionele controle van een leverspecifieke glucose-6-fosfatase promotor en enhancer. Hierdoor komt het transgen *G6PC* specifiek tot expressie in de lever. Het transgen is codon-geoptimaliseerd, waardoor een verhoogde eiwitexpressie bewerkstelligd kan worden en het aantal mogelijke alternatieve open leesramen verminderd wordt. Verder bevat het ggo een chimeer HBB intron om een verhoogde eiwitexpressie te verkrijgen. De expressiecassette bevat daarnaast het polyadenyleringssignaal (pA) van Simian virus 40 (SV40). Tussen de bovengenoemde

elementen in de expressiecassette liggen enkele niet-functionele korte sequenties. Dit zijn overblijfselen als gevolg van de assemblage en bevatten geen coderende sequenties.

#### **1.4 Productie van de gg-AAV vector**

Voor de productie van DTX401 wordt gebruik gemaakt van drie plasmiden. Het 'transgen plasmide' bevat het genoom van het beoogde gg-AAV geflankeerd door AAV-2 ITR's. Een adenovirus (AdV) helper plasmide codeert voor de helpervirus eiwitten E2A, E4 en het 'viral associated' (VA) RNA. Verder wordt gebruik gemaakt van een AAV helper plasmide Rep2/Cap8, welke *in trans* de AAV-8 VP eiwitten en AAV-2 Rep eiwitten aanlevert. Hierdoor wordt de vector omhuld met het manteleiwit van AAV serotype 8 en ontstaat een AAV2/8 gepseudotypeerd virusdeeltje. De keuze voor het AAV-8 capsid is ingegeven door het feit dat dit serotype een sterk levertropisme heeft.<sup>16,17,18</sup> De virale vector DTX401 wordt in het buitenland geproduceerd door het bedrijf Paragon Bioservices door de genoemde plasmiden te co-transfecteren in HEK293 cellen (een humane embryonale niercellijn). Deze HEK293 cellen brengen de *E1A* en *E1B* genen van HAdV-5 constitutief tot expressie, wat eveneens nodig is voor de productie van gg-AAV vector. De productie maakt geen deel uit van de onderhavige vergunningaanvraag.

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

De COGEM heeft verschillende keren geadviseerd over de mogelijke risico's voor mens en milieu van klinische studies met gg-AAV vectoren. In 2005 betrof het een studie met een gg-AAV vector die codeert voor het lipoproteïne lipase (LPL) ter behandeling van patiënten met een LPL deficiëntie.<sup>19</sup> In 2013 betrof het een studie met een gg-AAV vector die codeert voor het 'sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase' (SERCA2a) ter behandeling van patiënten met hartfalen.<sup>20</sup> In 2015 en 2018 heeft de COGEM geadviseerd over een fase I/II klinische studie met gg-AAV waar een expressiecassette voor humaan stollingsfactor IX (hFIX) was ingebracht ten behoeve van de behandeling van patiënten met matig ernstige tot ernstige hemofilie B.<sup>21,22</sup> In 2016 heeft de COGEM geadviseerd over een fase I klinische studie met een gg-AAV vector die codeert voor het humane Interferon- $\beta$  (hIFN- $\beta$ ) ter behandeling van patiënten met reumatoïde artritis.<sup>23</sup> Tot slot heeft de COGEM in 2017 geadviseerd over een klinische studie met een gg-AAV vector die codeert voor het hUGT1A1 eiwit ter behandeling van patiënten met het Crigler-Najjar syndroom.<sup>24</sup>

In alle zes studies achtte de COGEM de kans op uitscheiding van de gg-AAV vector aanwezig. Om de eventuele nadelige effecten van uitscheiding te minimaliseren, adviseerde de COGEM enkele aanvullende voorschriften te hanteren, of stemde zij in met de voorgestelde voorschriften van de aanvrager:

- Patiënten dienen effectieve anticonceptie in combinatie met een barrièremiddel in acht te nemen gedurende de eerste drie maanden na behandeling of totdat er na een periode van 75 dagen gedurende drie opeenvolgende testen geen vector-DNA in het sperma kan worden aangetoond;
- De vector wordt niet toegepast wanneer er klinische aanwijzingen zijn voor een actieve virale infectie;
- De behandelde patiënten worden uitgesloten van donatie van bloed, cellen en weefsels.

Onder navolging van bovengenoemde voorschriften en op basis van het apathogene en replicatie-deficiënte karakter van de gebruikte gg-AAV-vectoren, achtte de COGEM de milieurisico's ten gevolge van uitscheiding verwaarloosbaar klein, en adviseerde zij positief over de zes klinische studies.

Overigens plaatste de COGEM bij het meest recente advies uit 2018 een kanttekening bij het voorschrift over het niet toepassen van de gg-AAV vector als er klinische aanwijzingen zijn voor een actieve virale infectie.<sup>22</sup> 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, wildtype AAV en helpervirus. Daardoor is de COGEM van oordeel dat de kans op verdere verspreiding van de gg-AAV vector verwaarloosbaar klein is. 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 wildtype AAV.

Het laatste 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.<sup>21,22,23</sup>

### **3. Informatie over de klinische studie**

#### **3.1 Opzet van de studie**

De klinische studie met DTX401 zal plaatsvinden in het Universitair Medisch Centrum Groningen (UMCG). In deze studie ontvangen maximaal 50 patiënten éénmalig een startdoserings DTX401 van  $2 \times 10^{12}$  vectorgenomen per kilogram (vg/kg). Deze dosering kan oplopen tot maximaal  $1 \times 10^{13}$  vg/kg. De vector wordt toegediend via een intraveneuze katheter in een perifere ader.

De infuuszak met het ggo wordt in een veiligheidskabinet van klasse II voorbereid. Tijdens de preparatie van het ggo dragen de medewerkers beschermende kleding en handschoenen. De infuuszak wordt in een gesloten container naar de kamer van de patiënt gebracht waar het ggo zal worden toegediend. Ook tijdens de toediening van het ggo draagt het medisch personeel beschermende kleding. Vorming van aerosolen en morsen zal zoveel mogelijk worden voorkomen. Na de toediening worden de gebruikte oppervlaktes in de behandelkamer gedecontamineerd met een desinfectans (250 ppm chloor oplossing, of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> doekjes). Wanneer er vloeistof gemorst wordt, wordt dit met een 1000 ppm chlooroplossing schoongemaakt. De patiënten blijven 24 uur na toediening in het ziekenhuis en worden aansluitend 52 weken gemonitord. Daarbij zal de aanvrager op verschillende tijdstippen urine-, speeksel-, feces-, en bloedmonsters afnemen bij de patiënten om de eventuele aanwezigheid van vector DNA te kunnen bepalen. Speeksel-, urine- en fecesmonsters worden afgenomen totdat drie opeenvolgende monsters negatief testen voor vector DNA (LLoQ: 20vg/reactie). De monsters worden bij de patiënt thuis afgenomen en naar een GLP-gecertificeerd laboratorium gebracht om de mogelijke aanwezigheid van DTX401 te detecteren. Er worden geen aanvullende maatregelen gehanteerd naast de standaard hygiëne voorschriften bij afname van de monsters.

Bij de selectie van patiënten voor deze studie worden onder andere de volgende inclusie- en exclusiecriteria gehanteerd:

- Patiënten die seksueel actief zijn dienen effectieve contraceptie in de vorm van een fysiek barrière middel in acht te nemen gedurende 52 weken na behandeling;
- Patiënten met een actieve hepatitis B of C infectie (of met een geschiedenis van behandeling tegen deze infecties), of een andere actieve (virale of bacteriële) worden uitgesloten van de studie;
- Patiënten met een geschiedenis van HIV infectie en een CD4+ 'cellcount' van  $<350$  cellen/mm<sup>3</sup>, verandering in retrovirale therapie binnen 6 maanden voorafgaand aan de behandeling, of een 'viral load' van  $>200$  kopieën per ml die op 2 verschillende momenten is aangetoond, worden uitgesloten van de studie;
- Patiënten die behandeld zijn met het ggo worden uitgesloten van donatie van bloed, organen, weefsels en cellen voor transplantatie.

#### **4. Overweging**

In de onderhavige aanvraag wordt de replicatiedeficiënte vector DTX401 toegediend aan patiënten met de glycopeenstapelingsziekte GSD1a. Mogelijke risico's die hierbij kunnen optreden, hebben betrekking op de pathogeniteit van het 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 Pathogeniteit en karakterisatie van het ggo***

###### ***4.1.1 Pathogeniteit***

De in onderhavige studie gebruikte virale vector is gebaseerd op een apathogeen oudervirus. Het tropisme van de vector is, vanwege het AAV-8 manteleiwit hetzelfde als het wild-type AAV-8. Het wild-type virus kan alleen repliceren in de aanwezigheid van een helpervirus. Infectie met AAV is niet geassocieerd met ziekte bij de mens.

De vector bevat de ITR's van het wild-type AAV-2 die nodig zijn voor het inpakken van het genetische materiaal in een virusdeeltje. De *rep* en *cap* sequenties zijn verwijderd en vervangen door het *G6PC* gen dat codeert voor G6Pase. Door het ontbreken van de Rep- en capsid-eiwitten kan DTX401 zich ook in aanwezigheid van een helpervirus niet meer in geïnfecteerde cellen repliceren. Ook integratie in chromosoom 19 en de kans op insertionele mutagenese is daarmee verwaarloosbaar klein. Aangezien de expressie van G6Pase in de vector onder controle staat van de leverspecifieke *G6PC* enhancer/promotor sequentie is de expressie van G6Pase beperkt tot de lever.

Het enzym waarvoor de *G6PC* sequentie in de vector codeert, is van nature in menselijke cellen aanwezig. Het G6Pase wordt voornamelijk geproduceerd in de lever, nieren en darmen en zet G6P om in glucose en fosfaat. Overexpressie van het enzym is gerelateerd aan diabetes mellitus in mensen en hyperglycemie in ratten. Toediening van DTX401 aan wildtype muizen in een dosering van  $1 \times 10^{13}$  vg/kg (zoals gebruikt in onderhavige aanvraag) werd echter goed getolereerd.

Op basis van bovenstaande overwegingen is de COGEM van oordeel dat de DTX401vector apathogeen is.

#### *4.1.2 Moleculaire karakterisering*

De aanvrager heeft het transgenplasmide en de Rep2/Cap8 AAV helper plasmide volledig gesequenced. De adenovirale helperplasmide is ook geverifieerd met behulp van Adenovirus serotype 5 sequenties. De sequentie van het AAV2 *rep* gen in de helper plasmide is 100% identiek bevonden aan de wildtype AAV *rep* sequentie. Het AAV8 *cap* gen was voor 99,91% identiek aan de wildtype sequentie, hier zijn 2 nucleotidewijzigingen gedetecteerd. Deze mutaties hebben echter geen gevolgen voor het gevormde aminozuur; de aminozuursequentie is wel 100% identiek. De identiteit van DTX401 is bevestigd door middel van een 2-voudige ‘sequencing coverage’ met behulp van primer walking. De ITR sequenties in DTX401 zijn identiek aan de wildtype AAV ITR sequenties. De sequenties van het vector DNA waren 100% identiek aan de referentiesequenties van de G6PC promotor, het HBB intron, het codon geoptimaliseerde G6PC transgen, en het SV40 pA. Ook is de identiteit van de vector kwalitatief bevestigd met behulp van een Western blot. Hierbij is het moleculair gewicht van de drie VP eiwitten (VP1, VP2 en VP3) in beeld gebracht, en vergeleken met een gekwalificeerde referentie standaard.

Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van oordeel dat de moleculaire karakterisering van DTX401 volledig is.

#### **4.2 Uitscheiding**

Behandelde patiënten worden niet in isolatie gehouden en mogen 24 uur na toediening het ziekenhuis verlaten. Hierdoor kan het ggo zowel in het ziekenhuis als in de thuissituatie of elders in het milieu worden uitgescheiden via urine, speeksel, bloed en sperma. Verscheidene (pre-)klinische studies met andere vergelijkbare AAV vectoren<sup>18,25,26,27,28</sup> laten zien dat shedding van AAV vectordeeltjes gedurende meerdere weken na behandeling plaatsvindt. Dit is echter een tijdelijk fenomeen omdat de virusvectoren replicatiedeficiënt zijn. Gegevens van een langlopende klinische vervolgstudie uit 2014, waarin een AAV8 vector (AAV8-FIX) eenmalig intraveneus werd toegediend aan patiënten met hemofilie, laten zien dat de mate van uitscheiding afhankelijk is van de toegediende dosis, en dat bij de hoogste dosering ( $2 \times 10^{12}$  vectorgenoomkopieën per kg) zeven weken na toediening geen vector meer werd uitgescheiden.<sup>18</sup> De hoogste dosering van een gg-AAV vector tot dusver betreft een studie met een AAV-5 vector ter behandeling van hemofilie A.<sup>29</sup> Hierbij werd als hoogste dosering  $6 \times 10^{13}$  vg/kg toegediend. De mate van uitscheiding was het hoogst in week 1 tot 4, en nam geleidelijk af. In week 52 werd vector DNA nog gedetecteerd in het bloed, maar werd niet meer uitgescheiden in urine (uitscheiding tot 28 weken), sperma en speeksel (beide uitscheiding tot week 52). Uitscheiding in feces was niet meer detecteerbaar in week 52.

Op basis van bovenstaande gegevens stelt de aanvrager dat uitscheiding van DTX401 1 tot 7 weken na toediening plaats kan vinden, maar dat de hoeveelheid vector DNA in deze periode geleidelijk af zal nemen. Wanneer er vector DNA in lichaamsvloeistoffen wordt aangetoond, betekent dit niet dat het ook daadwerkelijk infectieus DTX401 betreft. De kans op aanwezigheid van infectieus gg-AAV wordt



verder verkleind zodra de patiënt neutraliserende antilichamen heeft ontwikkeld tegen AAV-8.<sup>18</sup> Ook geeft de aanvrager aan dat endogene proteolytische enzymen in staat zijn de capside eiwitten van DTX401 af te breken, die vervolgens in de urine worden uitgescheiden. De kans dat de vector na infectie van een cel zich verder zal verspreiden, acht de COGEM verwaarloosbaar klein, omdat naast een helpervirus ook de verwijderde *rep* en *cap* sequenties nodig zijn voor replicatie.

AAV vector DNA kan enkele weken tot maanden aangetoond worden in sperma. Dit is echter een tijdelijk fenomeen en de vector wordt voornamelijk aangetoond in de vloeistof en niet in de motiele fractie.<sup>30,31</sup> Recent is in de literatuur beschreven dat AAV latent persisteert in bepaalde lymfocyten en daardoor in sperma aanwezig kan zijn.<sup>32,33</sup> De COGEM acht de kans op kiembaantransmissie verwaarloosbaar klein, mede gezien het feit dat AAV vectoren niet efficiënt integreren in het genoom maar voornamelijk episomaal aanwezig zijn, en hierdoor niet persisteren in actief replicerende cellen. Daarnaast is AAV kiembaantransmissie nooit beschreven in de literatuur.<sup>25,34,35,36,37</sup> De aanvrager stelt als voorwaarde dat patiënten die seksueel actief zijn effectieve anticonceptie in de vorm van een fysiek barrièremiddel in acht dienen te nemen gedurende de studie (52 weken). De COGEM kan instemmen met het aanbevelen van effectieve contraceptie om onbedoelde blootstelling van derden te voorkomen.

#### **4.3 Recombinatie en complementatie**

Het ggo wordt geproduceerd door co-transfectie van de cellijn HEK293 met drie verschillende plasmiden. Het ‘transgen plasmide’ levert het genoom voor DTX401. Het adenovirus helper plasmide codeert voor de helpervirus eiwitten E2A, E4 en VA RNA en het AAV helper plasmide codeert voor de AAV-2 Rep en AAV-8 Cap eiwitten.

##### **4.3.1 Replicatiecompetent AAV**

DTX401 is een replicatiedefectieve virale vector, welke zelfs in aanwezigheid van een helpervirus niet in staat is tot replicatie. De aanvrager acht de kans dat er tijdens de productie ‘replicatiecompetent’ AAV (rcAAV<sup>a</sup>) ontstaat verwaarloosbaar klein. De aanvrager stelt dat recombinatie tussen DTX401 en SV40 door overlappende sequenties in het polyadeneringssignaal theoretisch mogelijk zou zijn, maar zeer onwaarschijnlijk is omdat co-infectie met SV40 daarvoor noodzakelijk is. SV40 is een lytisch virus met een ander tropisme dan AAV. Ook is de mate van overlap beperkt (137 nucleotiden). In het theoretische geval er recombinatie optreedt, zal het nieuw gevormde virus niet kunnen repliceren door afwezigheid van de SV40 ‘origin of replication’.

Ook is de kans op het ontstaan van rcAAV gereduceerd door gebruik te maken van drie verschillende plasmiden. Theoretisch gezien zou niet-homologe recombinatie tussen het Rep2/Cap8 AAV helper plasmide en vectorsequenties kunnen leiden tot rcAAV, maar deze zou nog steeds afhankelijk zijn van een helpervirus om te kunnen repliceren.<sup>38</sup>

---

<sup>a</sup> De term ‘replicatiecompetent’ AAV wordt gebruikt om aan te geven dat de vector vergelijkbaar is met wildtype AAV. Hierbij moet vermeld worden dat AAV replicatiedeficient is en daarom niet kan repliceren in afwezigheid van helpervirussen.

De vectorbatch wordt voor gebruik gecontroleerd op de aanwezigheid van rcAAV, om de aanwezigheid van rcAAV uit te sluiten. In deze test wordt DTX401 tezamen met een adenovirus toegevoegd aan HEK293 cellen. Door co-infectie met een adenovirus zal eventueel gevormd rcAAV vermenigvuldigd worden. Na drie replicatieronden wordt een kweekmonster met een specifieke kwantitatieve PCR (qPCR) geanalyseerd op aanwezigheid van AAV-2 *rep* en AAV-8 *cap* DNA. Deze qPCR assay heeft een gevoeligheid van <1 rcAAV per  $1.0 \times 10^8$  DTX401 vectorgenoomkopieën. Als positieve controle wordt de wildtype hybride AAV-2/8 gebruikt. Een batch wordt geaccepteerd indien er geen rcAAV gedetecteerd is in  $1 \times 10^8$  vectorgenoomkopieën.

De COGEM acht de kans op aanwezigheid van rcAAV in de vectorbatch verwaarloosbaar klein, omdat er voor de productie van de vector drie verschillende plasmiden worden gebruikt, en de DTX401 batch voor gebruik getest wordt op de aanwezigheid van rcAAV.

#### 4.3.2 Aanwezigheid van niet-vector gerelateerde sequenties

Tijdens de productie van de AAV vector kunnen lage hoeveelheden plasmide DNA of gastheercel DNA sequenties aanwezig zijn in het eindproduct. Door behandeling met Benzonase kan de hoeveelheid gastheercel DNA dat in het vectorproduct terecht komt verminderd worden. Naast behandeling met Benzonase voert de aanvrager testen uit om DNA residuen te detecteren. Restant DNA afkomstig van plasmiden wordt gedetecteerd met behulp van qPCR gericht op het kanamycine resistentiegen (aanwezig op plasmiden ten behoeve van de selectie, LoD van de qPCR: 10 kopieën per reactie) of *rep/cap* genen (LoD: 100 kopieën per 5µl). Restant DNA afkomstig van de HEK293 cellijn wordt gedetecteerd met behulp van qPCR gericht op 18s DNA (LoD: 100 kopieën per 5µl) of het E1A gen (LoD: 10-100 'viral particles'). De aanvrager stelt dat de gevonden hoeveelheden residueel DNA overeenkomen met de gerapporteerde hoeveelheden uit publicaties met AAV vectoren die ook voor klinische toepassingen gebruikt worden.

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 (100 tot 1000 maal lager dan de betreffende AAV vector).<sup>39</sup> De aanwezigheid van deze heterologe sequenties in de vectorbatch leidt volgens de COGEM niet tot risico's voor mens en milieu, omdat deze sequenties geen selectief voordeel opleveren en zich niet verder kunnen verspreiden.

#### 4.3.3 Recombinatie en complementatie in de patiënt

Na toediening van het ggo aan de patiënt kan in theorie in aanwezigheid van wild-type AAV en helpervirus 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 *G6PC* expressiecassette van het ggo. In deze situatie ontstaat er geen nieuw recombinant virus, maar wederom het ggo of het wild-type AAV. De COGEM acht het risico van een homologe recombinatie met wild-type AAV derhalve verwaarloosbaar klein.

Door complementatie kunnen er in theorie in de patiënt opnieuw DTX401 deeltjes worden gevormd. Echter, de kans dat er in dezelfde cel in de lever zowel DTX401, 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 dan zal deze nog steeds replicatiedeficiënt zijn. De COGEM acht het risico ten gevolge van complementatie derhalve verwaarloosbaar klein.

## 5. Advies

De COGEM is van oordeel dat DTX401 afdoende moleculair is gekarakteriseerd en als apathogeen aangemerkt kan worden. Gezien het productiesysteem en de controle van de vectorbatch acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de vectorbatch rcAAV bevat. Ditzelfde geldt voor de kans op recombinatie of complementatie van DTX401 in de patiënt. Zij kan de kans op blootstelling van derden ten gevolge van uitscheiding van het toegediende ggo echter niet geheel uitsluiten. De COGEM is van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze voorgenomen klinische studie met DTX401 verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. Chou JY *et al.* (2017). Recent development and gene therapy for glycogen storage disease type Ia. *Liver Res.* 1: 174–180
2. Parikh NS & Ahlawat R (2018). Glycogen Storage Disease Type I (Von Gierke Disease). StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
3. Burda P & Hochuli M (2015). Hepatic glycogen storage disorders: what have we learned in recent years? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 18: 415-421
4. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 03 december 2018)
5. 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
6. 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
7. Salganik M *et al.* (2015). Adeno-associated Virus as a Mammalian DNA Vector. *Microbiol. Spectr.* 3: doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0052-2014
8. Sonntag F *et al.* (2010). A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 10220-5
9. Berns KI & Parrish CR (2013). Parvoviridae. In: Fields virology, volume 2, 6th edition. Edited by Knipe DM en Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
10. Smith RH (2008). Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther.* 15: 817-822
11. Flotte TR & Berns KI (2005). Adeno-associated virus: A ubiquitous commensal of mammals. *Hum. Gene Ther.* 16: 401-407
12. 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.* 2002 Aug;76(15):7554-9.
13. McCarty DM *et al.* (2004). Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu. Rev. Genet.* 38: 819-845
14. Gonçalves MA (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology J.* doi:10.1186/1743-422X-2-43

15. COGEM (2018). Adeno-associated dependoparvovirus A en *Adeno-associated dependoparvovirus B* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. COGEM advies CGM/180321-01
16. Nathwani AC *et al.* (2007). Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates. *Blood*. 109: 1414-1421
17. Nathwani AC *et al.* (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 365: 2357-2365
18. 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
19. 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
20. COGEM (2013). Een fase 2b klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met hartfalen. COGEM advies CGM/130603-01
21. 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
22. 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
23. COGEM (2016). Klinische studie met genetisch gemodificeerd *Adeno-associated virus* ter behandeling van patiënten met reumatoïde artritis (LUMC). COGEM advies CGM/160719-02
24. COGEM (2017). Klinische studie met gg-AAV in patiënten met het Crigler-Najjar syndroom. COGEM advies CGM/170821-01
25. 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
26. 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.
27. Favaro P *et al.* (2009). Host and vector-dependent effects on the risk of germline transmission of AAV vectors. *Mol. Ther.* 17: 1022-1030
28. Chen SJ *et al.* (2013). Biodistribution of AAV8 vectors expressing human low-density lipoprotein receptor in a mouse model of homozygous familial hypercholesterolemia. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 24: 154-160
29. Rangarajan S *et al.* (2017). AAV5–Factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 377: 2519-2530
30. Manno CS *et al.* (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* 12: 342-347
31. Schuettrumpf J *et al.* (2006). Inadvertent germline transmission of AAV2 vector: findings in a rabbit model correlate with those in a human clinical trial. *Mol. Ther.* 13: 1064-1073

32. Hüser D et al. (2017). High prevalence of infectious adeno-associated virus (AAV) in human peripheral blood mononuclear cells indicative of T Lymphocytes as sites of AAV persistence. *J. Virol.* 91. doi: 10.1128/JVI.02137-16
33. Miesbach W et al. (2018). Gene therapy with adeno-associated virus vector 5–human factor IX in adults with hemophilia B. *Blood* 131: 1011-1031
34. Ehrhardt A *et al.* (2003). Episomal persistence of recombinant adenoviral vector genomes during the cell cycle *in vivo*. *J. Virol.* 77: 7689-7695
35. Chen ZY et al. (2001). Linear DNAs concatemerize *in vivo* and result in sustained transgene expression in mouse liver. *Mol. Ther.* 3: 403-410
36. Bortolussi G *et al.* (2014). Life-long correction of hyperbilirubinemia with a neonatal liver-specific AAV-mediated gene transfer in a lethal mouse model of Crigler-Najjar Syndrome. *Hum. Gene Ther.* 25: 844-855
37. Pañeda A *et al.* (2009). Effect of adeno-associated virus serotype and genomic structure on liver transduction and biodistribution in mice of both genders. *Hum. Gene Ther.* 20: 908-917
38. Wright JF (2009). Transient transfection methods for clinical adeno-associated viral vector production. *Hum. Gene Ther.* 20: 698-706
39. 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