

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

DATUM 7 februari 2023
KENMERK CGM/230207-01
ONDERWERP Advies klinische studie met WU-CART-007

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag getiteld 'A dose-escalation and dose-expansion study of the safety and efficacy of anti-CD7 allogeneic CAR-T cells (WU-CART-007) in patients with relapsed or refractory T-cell acute lymphoblastic leukemia (T ALL)/lymphoblastic lymphoma (LBL)' (IM-MV 22-014_000) van het Prinses Máxima Centrum, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de milieurisico's van een klinische studie met allogene (lichaamsvreemde), *ex vivo* (buiten het lichaam) genetisch gemodificeerde (gg-) T-cellen, die zullen worden toegediend aan patiënten met acute lymfoblastische leukemie (T-ALL) en/of lymfoblastair lymfoom (LBL). In deze cellen zijn eerst door middel van CRISPR/Cas9 (onderdelen van) in de T-cel aanwezige receptoren verwijderd en daarna zijn de cellen genetisch gemodificeerd met een lentivirale vector.

De COGEM heeft in 2020 geadviseerd over een generieke milieuriscobehoordeling voor klinische studies met cellen die *ex vivo* getransduceerd zijn met lenti- of retrovirale vectoren. Onder het voorbehoud dat de aanvrager bevestigt dat de sequenties in de plasmiden overeenkomen met de beoogde sequenties, voldoen de in onderhavige studie gebruikte cellen aan de criteria van deze generieke milieuriscobehoordeling, behalve dat ze voorafgaand aan de transductie genetisch gemodificeerd zijn met behulp van CRISPR/Cas9. Op basis van de aangeleverde informatie is de COGEM van oordeel dat voor deze vergunningaanvraag de risico's voor mens en milieu, als gevolg van het genetisch modificeren van de T-cellen met CRISPR/Cas9, verwaarloosbaar klein zijn. De aanvrager heeft afdoende bewezen dat er geen vrije virusdeeltjes in de monsters met toe te dienen gg-T-cellen aanwezig zijn. Samengevat is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen klinische studie 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.

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

Klinische studie met allogene *ex vivo* lentiviraal getransduceerde CAR T-cellen, waarin CD7 en de T-cel receptor alfa keten met CRISPR/Cas9 verwijderd zijn (WU-CART-007)

COGEM advies CGM/230207-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een klinische studie met genetisch gemodificeerde (gg-) allogene anti-CD7 ‘Chimeric Antigen Receptor’ (CAR) T-cellen (WU-CART-007) in patiënten met recidieve of refractaire T-cel acute lymfoblastische leukemie (T-ALL) en/of lymfoblastair lymfoom (LBL)’ (IM-MV 22-014). In de te gebruiken CAR T-cellen (het ggo) zijn door middel van CRISPR/CAS9 ribonucleoproteïne complexen (RNPs) de genen voor CD7 en de T-cel receptor alfa keten (‘TCR- α chain’, TRAC) verwijderd. Vervolgens is het ggo *ex vivo* lentiviraal getransduceerd, waardoor het een 2^e generatie 4-1BB-CD3 ζ ‘chimeric antigen receptor’ gericht tegen CD7 tot expressie brengt.

De aanvraag is afkomstig van het Prinses Máxima Centrum. Het doel van de studie is om de veiligheid, verdraagzaamheid en effectiviteit van de CAR T-cellen te onderzoeken in patiënten met de hierboven genoemde maligniteiten.

2. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2019 in een advies een generieke milieuristicobeoordeling voor klinische toepassingen met *ex vivo* retro- en lentiviraal getransduceerde cellen opgesteld en geoordeeld dat de risico’s voor mens en milieu bij klinische studies met deze gg-cellen verwaarloosbaar klein zijn, mits aan een aantal randvoorwaarden wordt voldaan.¹ Deze randvoorwaarden zijn in 2020 geüpdatet,² en zijn als volgt:

- Het generieke advies is van toepassing op zowel autologe als allogene cellen wanneer gebruik gemaakt wordt van retrovirale vectoren gebaseerd op het Moloney murine leukemia virus (MoMLV), of zelf-inactiverende (SIN) vectoren afgeleid van *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1), welke zijn geproduceerd met behulp van een 3^e generatie productiesysteem^{1,3};
- Het gebruikte transgen codeert niet voor sequenties die in staat zijn de replicatiedeficiënte retro- of lentivirale vector te complementeren, of voor schadelijke genproducten of (proto)oncogenen;
- Voor de moleculaire karakterisering geldt dat minimaal de vectorkaartjes en beschrijvingen van de productieplasmiden zijn overlegd door de aanvrager, en dat de aanvrager heeft bevestigd dat deze plasmiden gesequenced zijn en dat de retrovirale of lentivirale sequenties in de plasmiden identiek zijn aan de beoogde sequenties.

Specifiek voor klinische studies met lentivirale vectoren hanteert de COGEM daarnaast de volgende randvoorwaarden:

- Als de aanwezigheid van vrije lentivirale vectordeeltjes niet kan worden uitgesloten, dienen de volgende generieke maatregelen in acht genomen te worden⁴:

- o Na toediening van het medisch product (*ex vivo* lentiviraal getransduceerde gg-cellen) blijft de patiënt minimaal 16 uur in het ziekenhuis opgenomen, zodat de standaard ziekenhuishygiënische maatregelen in acht genomen kunnen worden;
- o Na toediening van het medisch product wordt de infuusinsteekplaats met een adequate methode gedesinfecteerd om resterende cellen en vectordeeltjes te inactiveren, en worden standaard ziekenhuishygiënische maatregelen tijdens de verzorging van de patiënt in acht genomen;
- o Patiënt, medisch personeel en bezoekers worden voorgelicht hoe de eerste 16 uur na toediening van het medisch product er ten aanzien van wondverzorging en besmet materiaal moet worden omgegaan.

Het uitsluiten van HIV-1 en HIV-2 patiënten bij klinische studies met lentivirale vectoren, is vervallen als randvoorwaarde van de generieke milieurisicobeoordeling.

De COGEM heeft eerder positief geadviseerd over een klinische studie met allogene gg-T-cellen die *ex vivo* genetisch gemodificeerd waren met behulp van CRISPR-Cas9 RNP-complexen, waarna de cellen behandeld werden met adenovirus-associated virus (AAV)-vectoren.⁵ Tevens heeft de COGEM positief geadviseerd over een klinische studie met autologe gg-T-cellen die *ex vivo* genetisch gemodificeerd waren met behulp van RNP's en DNA 'repair templates'.⁶

3. Samenstelling en productie van WU-CART-007 (allogene anti-CD7 CAR T-cellen)

Het medisch product WU-CART-007 bestaat uit allogene gg-T-cellen. De T-cellen worden uit gezonde donoren geïsoleerd die negatief zijn getest voor *Hepatitis B virus* (HBV), *Hepatitis C virus* (HCV), HIV-1/2, Human T-lymphotropic virus 1/2 (HTLV-1/2), *Cytomegalovirus* (CMV), West Nile Virus (WNV), en de ziekte van Chagas en Syfilis. De cellen worden eerst *ex vivo* genetisch gemodificeerd door middel van CRISPR-CAS9 ribonucleoproteïnes (RNPs). Hiertoe worden 'guide RNA's' gericht tegen in de T-cel aanwezige CD7 en T-cel-receptor-alfa-keten (TRAC) samen met SpyFi Cas9 eiwitten geëlectroporeerd in de geïsoleerde CD4/8+ T-cellen. Het verwijderen van de CD7 en TRAC genen voorkomt respectievelijk dat de T-cellen elkaar herkennen en vernietigen ('self-killing') en de kans op 'graft-versus-host-disease' (GvHD).^{7,8}

Om de chimere anti-CD7 receptor (anti-CD7 CAR) in de gg-T-cellen tot expressie te brengen, worden de cellen getransduceerd met een zelf-inactiverende (SIN) lentivirale vector die gebaseerd is op HIV-1, gepseudotypeerd is met het oppervlakte-eiwit van Vesicular stomatitis Indiana virus (VSV-G) en geproduceerd is met een derde generatie productiesysteem.^{1,3} De CAR-cassette bestaat uit een 2^e generatie 4-1BB-CD3ζ anti-CD7 CAR gericht op CD7+ T-cel maligniteiten. Het transgen bevat naast de CAR-cassette, sequenties die coderen voor ingekort CD34 eiwit, welke als surrogaatmarker voor CAR-expressie dient en met flowcytometrie gedetecteerd kan worden. Ook is er nog een '2A element' op het transgen aanwezig, dat het ingekorte CD34-eiwit van de CAR-cassette scheidt. De coderende sequenties op het transgen worden door middel van een 'human elongation factor-1 alpha' (EF-1α) promotor tot expressie gebracht.

De aanvrager geeft aan dat het transduceren van de cellen plaatsvindt op dag 2 van de productie van het medisch product, en dat de rest van het productieproces (kweektijd, wasstappen, zuivering) 15 dagen duurt. De aanvrager stelt dat via een gevalideerde qPCR-test de afwezigheid van replicatiecompetent lentivirus (RCL) wordt aangetoond voor elke batch WU-CART-007. Het medisch product wordt alleen vrijgegeven als deze vrij is van HIV-1/2, HTLV-1/2, *Hepatitis A* (HAV), HBV, HCV, Human herpesvirus 6/7/8, Herpes simplexvirus 1/2, CMV, Epstein-Barr virus en Parvovirus B19. De productie van de lentivirale vectoren en gg-T-cellen vindt plaats in het buitenland en maakt geen deel uit van de voorliggende vergunningaanvraag.

4. De klinische studie in het kort

In totaal worden er voor deze studie 12 patiënten in het Prinses Máxima Centrum behandeld met WU-CART-007. Deze gg-CAR T-cellen worden intraveneus aan de proefpersonen toegediend met een maximale dosis van 18×10^6 cellen/kg lichaamsgewicht. Handelingen met- en toediening van WU-CART-007 vinden plaats conform standaard ziekenhuismaatregelen, en in de behandelkamers worden de hygiënemaatregelen conform de behandeling voor immuun-gecompromiteerde patiënten aangehouden. De CAR T-cellen worden getransporteerd in lek- en breekvaste containers.

Monitoring vindt gedurende 5 jaar plaats, waarbij in bloedmonsters de aanwezigheid van de CAR T-cellen en de creatine kinase (CK) activiteit worden bepaald. Deze waarden worden gedurende 15 jaar iedere 6 maanden opnieuw vastgesteld. Op de eerste dag na aanvang van de studie en na 3, 6, 12 en 24 maanden worden bloedmonsters afgenomen en wordt de aanwezigheid van RCL onderzocht als deze uitslag niet negatief was bij een eerdere test. Als RCL bij een patiënt wordt aangetoond, wordt de aanwezigheid van RCL in deze patiënt jaarlijks gemeten totdat deze niet meer gedetecteerd kan worden. De aanvrager stelt dat patiënten die met de gg-CAR T-cellen behandeld zijn, moeten afzien van het doneren van bloed, cellen, organen of weefsels. Uit het dossier is niet duidelijk of deze exclusiecriteria levenslang of voor de duur van de studie gelden.

5. Overwegingen

De COGEM heeft randvoorwaarden gedefinieerd voor een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische studies met *ex vivo* lentiviraal getransduceerde cellen. De onderhavige klinische studie betreft een aanvraag voor het gebruik van T-cellen die genetisch zijn gemodificeerd met behulp van CRISPR/Cas9 RNPs, alvorens transductie met de SIN lentivirale vector plaatsvindt, waardoor het gebruik van deze T-cellen afwijkt van de generieke randvoorwaarden.

5.1 Aanwezigheid CRISPR/Cas9 ribonucleoproteïne complexen (RNPs)

De anti-CD7 en TRAC 'guide RNA's' worden samen met de SpyFi Cas9-eiwitten geëlectroporeerd in de T-cellen. Bij het electroporeren van de T-cellen kunnen losse RNP's buiten de cel achterblijven, waardoor in theorie residuele RNP's kunnen meekomen bij het toedienen van het medisch product aan de patiënt. De aanvrager stelt dat in het uiteindelijke product on- en off target 'gene editing' effecten worden beoordeeld en dat de hoeveelheid Cas9-eiwit niet boven de 'baseline' uitkomt, maar heeft deze gegevens, de betekenis/waarde van de baseline en de methode waarop deze gegevens vastgesteld worden, niet aan het dossier toegevoegd. RNP's zijn echter na 24 uur in *ex vivo* gecultiveerde cellen nog

nauwelijks detecteerbaar, en na 48 uur niet meer aan te tonen via 'western blotting'.⁹ De cellen worden na transductie 15 dagen gekweekt, alvorens het product klaar is voor gebruik in de proefpersonen. In het onwaarschijnlijke geval dat CRISPR/Cas9 RNP's in het medisch product aanwezig zijn en het medisch product in het milieu of een derde terechtkomt, bijvoorbeeld bij prikaccidenten, kunnen deze RNPs alleen via electroporatie of een 'carrier' de cel worden ingebracht. Onder natuurlijke omstandigheden komt dit niet voor. Daarnaast worden de T-cellen en de CRISPR/Cas9 RNP's waarschijnlijk door het afweersysteem van de ontvanger verwijderd.¹⁰ De T-cellen kunnen buiten de mens niet overleven.

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij eventuele resterende aanwezigheid van de CRISPR/Cas9 RNPs in het medisch product, verwaarloosbaar klein zijn.

5.2 Moleculaire karakterisering van de lentivirale vector

In de onderhavige aanvraag zijn vectorkaartjes en beschrijvingen van de productieplasmiden in het vertrouwelijke deel van de aanvraag overlegd. De aanvrager geeft aan dat de identiteit van de LTR's en tussengelegen sequenties door middel van sequencing bevestigd zijn.

Onder het voorbehoud dat de aanvrager bevestigt dat de lentivirale sequenties identiek zijn aan de beoogde sequenties, is de COGEM van oordeel dat de aanvrager de moleculaire karakterisering voldoende heeft uitgevoerd.

5.3 De aanwezigheid van vrije lentivirale vectordeeltjes in WU-CART-007

De COGEM is er een voorstander van dat aanvragers experimenteel onderzoeken of er vrije vectordeeltjes in *ex vivo* getransduceerde celsuspensies aanwezig zijn. Zij is van mening dat, als er geen gevalideerde test is aangeleverd, een theoretische benadering van de hoeveelheid vrije deeltjes aan de hand van een berekening inzicht geeft in de waarschijnlijkheid dat er nog vrije deeltjes aanwezig zijn, bijvoorbeeld door het gebruik van de COGEM-formule.^{4,11}

De aanvrager laat aan de hand van een berekening zien dat door het uitvoeren van wasstappen en het vervangen van kweekmedium, de totale verdunningsfactor van de vrije vectordeeltjes na de transductie $7,1 \times 10^{10}$ bedraagt. De aanvrager gaat hierbij uit van een reductiefactor van 6,7, een kweektijd van 15 dagen, 22 wasstappen (15 mediumverversingen en 7 wasstappen), en $2,8 \times 10^9$ virale deeltjes in het oorspronkelijke inoculum. Na het toepassen van de berekende verdunningsfactor, kan op basis van de geleverde berekening uitgegaan worden van een eindconcentratie van $3,94 \times 10^{-2}$ virale deeltjes in het eindproduct. Op grond van deze berekening stelt de aanvrager dat de kans verwaarloosbaar klein is dat er nog vrije vectordeeltjes in WU-CART-007 aanwezig zijn.

De COGEM merkt op dat de aanvrager niet inzichtelijk heeft gemaakt hoe de parameters, die voor het berekenen van de verdunningsfactor worden gebruikt, waaronder de reductiefactor van 6,7, zijn verkregen. Tevens merkt de COGEM op dat in het Europese 'Good Practice' document, waarin naar de COGEM-formule verwezen wordt, wordt gesteld dat de toegepaste reductiefactor ondersteund moet worden door een uitleg en/of gevalideerde data van de aanvrager.¹² De wasstappen, het natuurlijk verval

van de vectordeeltjes, en de reductie van het aantal vrije vectordeeltjes door opname in de cellen in overweging nemende, acht de COGEM echter de kans verwaarloosbaar klein dat in het medisch product WU-CART-007 vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes aanwezig zijn.

6. Conclusie en advies

De COGEM heeft in 2020 geadviseerd over een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen.² Onder inachtneming van een aantal criteria, stemde de COGEM met de ter beoordeling voorgelegde milieurisicobeoordeling in. De in onderhavige studie gebruikte cellen voldoen aan deze criteria, maar zijn voorafgaand aan de transductie genetisch gemodificeerd door middel van CRISPR/Cas9 RNP's.

Met betrekking tot deze modificatie, acht de COGEM op basis van de aangeleverde informatie de risico's van mogelijk resterende CRISPR/Cas9 RNPs in het medisch product voor mens en milieu verwaarloosbaar klein. De COGEM is van oordeel dat de lentivirale vector afdoende moleculair is gekarakteriseerd, indien de aanvrager bevestigt aan de vergunningverlener dat de lentivirale sequenties in de plasmiden identiek zijn aan de beoogde sequenties. De commissie acht de kans verwaarloosbaar klein dat derden aan vrije vectordeeltjes worden blootgesteld. Samengevat is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij voorgenomen klinische studie met WU-CART-007 verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. COGEM (2019). Generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met *ex vivo* retro- en lentiviraal getransduceerde cellen. COGEM advies CGM/190729-01
2. COGEM (2020). Advies betreffende procedures van markttoelatingen van medische ggo-producten die onder de generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies vallen. COGEM advies CGM/201214-02
3. Regeling GGO 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2019-07-01#Bijlage5> (bezocht 10 januari 2023)
4. COGEM (2020). Generiek advies over de milieurisicobeoordeling van klinische studies met *ex vivo* lentiviraal getransduceerde cellen: aanwezigheid van vrije vectordeeltjes in het medisch product. COGEM advies CGM/200507-01.
5. COGEM (2020). Klinische studie met allogene *ex vivo* recombinant AAV-vector getransduceerde T-cellen (CTX130). COGEM advies CGM/201029-01
6. COGEM (2021). Klinische studie met gg-T-cellen, waarin de T-celreceptoren met behulp van nucleases zijn aangepast tegen neo-antigenen in solide tumoren. COGEM advies CGM/211202-01
7. Gomes-Silva D *et al.* (2017). CD7-edited T cells expressing a CD7-specific CAR for the therapy of T-cell malignancies. *Blood*. 130: 285-296
8. Torikai H *et al.* (2012). A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. *Blood*. 119: 5697-5705

9. Kim S et al. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome res.* 24: 1012–1019
10. Charlesworth CT et al. (2019). Identification of pre-existing adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat. Med.* 25: 249–254
11. COGEM (2020). The COGEM formula revisited. Experimental validation of the reduction ratio formula for three lentiviral particles. COGEM onderzoeksrapport CGM/2020-01
12. Good Practice on the assessment of GMO-related aspects in the context of clinical trials with human cells genetically modified. https://health.ec.europa.eu/system/files/2021-11/gmcells_gp_en_0.pdf (bezocht 11 januari 2023)