

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

DATUM 21 maart 2024
KENMERK CGM/240321-01
ONDERWERP Advies klinische studie met gg-T-cellen (Allo-RevCAR01-T) tegen
hematologische maligniteiten

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende drie vergunningaanvragen getiteld 'Multicenter, Open-label, Phase 1 Study of Allo-RevCAR01-TCD123 Consisting of Genetically Modified T Cells Carrying Reverse Chimeric Antigen Receptors (Allo-RevCAR01-T) in Combination with CD123 Target Module (R-TM123) for the Treatment of Patients with Selected Hematologic Malignancies Positive for CD123' (IM-MV 23-014_000, IM-MV 23-015_000 en IM-MV 23-017_000) van het Erasmus MC, UMC Groningen en het Amsterdam UMC, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de milieurisico's van een klinische studie met lichaamsvreemde, *ex vivo* (buiten het lichaam) genetisch gemodificeerde (gg-) T-cellen, die worden toegediend aan patiënten met bepaalde vormen van bloedkanker. In deze T-cellen zijn eerst door middel van CRISPR-Cas9 wijzigingen in het genoom aangebracht, zodat de cellen niet afgestoten worden door het immuunsysteem van de patiënt. Vervolgens zijn de cellen genetisch gemodificeerd met een retrovirale vector om een nieuwe 'chimere antigen receptor' (CAR) tot expressie te brengen. De COGEM heeft in 2020 een generieke milieurisicobeoordeling uitgevoerd voor klinische studies met cellen die *ex vivo* getransduceerd zijn met lenti- of retrovirale vectoren. De in de onderhavige studie gebruikte gg-cellen voldoen aan de criteria van deze generieke milieurisicobeoordeling, 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 vectordeeltjes of replicatiecompetent virus aanwezig zijn in de toe te dienen gg-T-cellen. Samengevat is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen klinische studie verwaarloosbaar klein zijn. Tevens adviseert de COGEM dat de geldende generieke milieurisicobeoordeling voor klinische studies met *ex vivo* retro- of lentiviraal getransduceerde cellen eveneens toegepast kan worden onder de randvoorwaarde dat *ex vivo* gene-editing plaatsvindt met 'targeted nucleases' in de vorm van mRNA, naakt DNA, of eiwitcomplexen (RNP's).

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
 - Drs. K.E. Kok, Ministerie van VWS

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling zijn de COGEM leden dr. A.T. Das, prof. dr. C.M.F. Dirven en dr. M. de Graaf niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Fase I klinische studie met genetisch gemodificeerde CAR T-cellen verkregen met een retrovirale vector en waarin met CRISPR-Cas9 wijzigingen zijn aangebracht (Allo-RevCAR01-T)

COGEM advies CGM/240321-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een klinische studie met genetisch gemodificeerde (gg-) allogene ‘Chimeric Antigen Receptor’ (CAR) T-cellen (Allo-RevCAR01-T) in patiënten met CD123-positieve hematologische maligniteiten. De aanvraag is afkomstig van drie universitaire medische centra, die een identieke (kopie) vergunningaanvraag hebben ingediend (IM-MV 23-014 van het Erasmus MC, IM-MV 23-015 van het UMC Groningen, en IM-MV 23-017 van het Amsterdam UMC). In de te gebruiken CAR T-cellen (het ggo) zijn met behulp van CRISPR-Cas9 de genen voor de endogene T-cel receptor en delen van het ‘human leukocyte antigen’ (HLA) systeem verwijderd. Vervolgens zijn de cellen *ex vivo* getransduceerd met een retrovirale vector, waardoor deze een CAR tot expressie brengen. Tegelijkertijd met de behandeling met deze gg-cellen zal een monoklonaal antilichaam toegediend worden dat tijdelijk via een non-covalente binding aan de gg-T-cellen bindt om deze naar CD123-expresserende cellen te leiden en zo de behandeling te versterken. De behandeling met het monoklonale antilichaam valt buiten de milieurisicobeoordeling.

2. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2019 in een advies een generieke milieurisicobeoordeling 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 retro- of lentivirale sequenties in de plasmiden identiek zijn aan de beoogde sequenties.

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

- Er zijn geen vrije infectieuze vectordeeltjes in het terug te plaatsen medische product aanwezig;

- De vectorbatch, de ‘end of production’ cellen, of het uiteindelijke medische product (de getransduceerde cellen) worden door middel van een gevalideerde test gecontroleerd op de afwezigheid van replicatiecompetent retrovirus (RCR);
- Het medische product betreft geen macrofagen.

De COGEM heeft eerder positief geadviseerd over een klinische studie met allogene gg-T-cellen (WU-CART-007) die *ex vivo* genetisch gemodificeerd waren met behulp van door electroporatie ingebrachte CRISPR-Cas9 ribonucleoproteïne complexen (RNPs), waarmee de genen voor CD7 en ‘TCR- α chain’ (TRAC) verwijderd zijn. Vervolgens werden de cellen getransduceerd met een SIN lentivirale vector (gebaseerd is op HIV-1) om de CAR tot expressie te brengen.⁴ 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’.⁵

3. Samenstelling en productie van Allo-RevCAR01-T

Het medisch product Allo-RevCAR01-T bestaat uit allogene gg-T-cellen. De cellen worden eerst *ex vivo* genetisch gemodificeerd door middel van het CRISPR-Cas9 complex, dat als mRNA via lipide nanopartikels (LNP’s) in de cel wordt gebracht en daar transiënt tot expressie komt. Het CRISPR-Cas9 complex zorgt ervoor dat de sequentie van de endogene T-cel receptor verwijderd wordt, en delen van het HLA-systeem verwijderd worden. Hiermee kan voorkomen worden dat er een ‘graft-versus-host’ reactie optreedt in de patiënt en dat de gg-T-cellen niet als lichaamsvreemd beschouwd en afgestoten worden.

Om het RevCAR01 in de gg-T-cellen tot expressie te brengen, worden de cellen vervolgens getransduceerd met een retrovirale vector die gebaseerd is op het Moloney murine leukemia virus (MoMLV), en gepseudotyped is met het oppervlakte-eiwit van het *Gibbon ape leukemia virus* (GALV). Het CAR-transgen bevat een korte humane polypeptide tag, en elementen van de humane CD28 en CD3 ζ eiwitten. De coderende sequenties op het transgen worden door middel van een humane promotor tot expressie gebracht.

De aanvrager stelt dat met behulp van een ‘S+L- co-cultivation assay’ de afwezigheid van replicatiecompetent retrovirus (RCR) wordt aangetoond voor de ‘Master Cell Bank’ (MCB), de ‘end of production cells’ voor elke vectorbatch (EoP) en elke vectorsupernatantbatch (VSB). HIV-positieve patiënten en -donoren worden uitgesloten in deze studie.

4. Overwegingen

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

4.1 Aanwezigheid van CRISPR-Cas9 in het eindproduct

Het Cas9 mRNA en bijbehorende 'single guide RNA' (sgRNA) wordt in LNP's ingepakt en in de T-cellen getransfecteerd. De cellen worden na transductie enkele dagen gekweekt en 10 keer gewassen, alvorens het product klaar is voor gebruik in de proefpersonen. De aanvrager stelt dat door cumulatieve depletie en het wassen de uiteindelijke concentratie aan LNP's of CRISPR-Cas9 mRNA in het eindproduct (de gg-T-cellen), hoogstwaarschijnlijk verwaarloosbaar klein is. De COGEM merkt op dat LNP's *in vivo* een lagere transfectie-efficiëntie hebben, al vindt er wel veel onderzoek plaats naar aanpassingen om hier verbetering in aan te brengen.⁶ Er is in de aanvraag geen aanvullende informatie beschikbaar over de verwachte *in vivo* transductie-efficiëntie van de gebruikte LNP's. In het onwaarschijnlijke geval dat CRISPR-Cas9 LNP's toch in het medisch product aanwezig zijn en het medische product in het milieu of een derde terechtkomt, zal transfectie met CRISPR-Cas9 LNP's éénmalig zijn, zal de aanwezigheid van het Cas9 RNA en sgRNA en 'translated protein complexes' transiënt zijn, en zal geen verdere verspreiding optreden. In het theoretische geval dat derden onbedoeld blootgesteld worden aan LNP's in het medische product, zal gezien de zeer lage hoeveelheden potentiële onbedoelde transfectie van derden zeer beperkt zijn, en worden geen schadelijke effecten verwacht.

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 LNP's in het medisch product, verwaarloosbaar klein zijn.

4.2 Moleculaire karakterisering van de retrovirale vector

In de onderhavige aanvraag is een vectorkaartje en beschrijving van de elementen in de MoMLV-vector aanwezig in het vertrouwelijke deel van de aanvraag. Bij de productie van de vector zijn geen helperplasmiden toegepast, maar is gebruik gemaakt van een productiecellijn. De aanvrager geeft aan dat de complete vectorsequentie (inclusief LTR) in het vector supernatant en de 'end of production cells' door middel van sequensen gecontroleerd en bevestigd wordt.

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

4.3 Controle op aanwezigheid van replicatiecompetent retrovirus (RCR)

De MCB, EoP en elke VSB zullen getest worden op aanwezigheid van RCR door middel van een gevalideerde cGMP 'S+L- assay'. Voor het vectorsupernatant wordt een 'direct inoculation assay' toegepast. Hiervoor worden een aantal detectorcel monolagen geprepareerd en geïnoculeerd met het supernatant. Na vijf passages wordt het supernatant geoogst, gefilterd en getoetst op afwezigheid van RCR met een S+L- assay met een gevoeligheid (lower limit of detection (LLoD) van één 'focus forming unit' (ffu) in $0,66-4,1 \times 10^6$ infectieuze deeltjes.

De MCB en EoPC worden getest op RCR met een 'S+L- co-cultivation assay'. Hiervoor worden cellen van de MCB of EoPC gezamenlijk met detectorcellen gecocultiveerd. Na twee passages wordt het supernatant geoogst, gefilterd en geïnoculeerd op nieuwe detectorcel-monolagen, die gedurende drie passages worden gekweekt. Na in totaal minstens vijf passages, wordt het supernatant geoogst en getest met de S+L- assay met een gevoeligheid (LLoD) van 10 ffu.

De COGEM acht de S+/L- assay gevoelig genoeg om RCR te detecteren en is van oordeel dat de kans op de aanwezigheid van RCR verwaarloosbaar klein is.

4.4 De aanwezigheid van vrije lentivirale vectordeeltjes in Allo-RevCAR01-T

De COGEM is er 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.⁷

De aanvrager toont met de COGEM formule aan dat de totale reductieratio ongeveer $1,32 \times 10^{10}$ betreft. De aanvrager merkt op dat de halfwaardetijd van de GALV-gepseudotypeerde vectordeeltjes die gebruikt worden voor productie van allo-RevCAR01-T, experimenteel bepaald is en 8 uur bedraagt. Dit komt overeen met de halfwaardetijd die gepubliceerd is voor GALV-gepseudotypeerde lentivirale vectoren.^{7,8} Op grond van deze berekening acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat in het medisch product Allo-RevCAR01-T vrije infectieuze retrovirale vectordeeltjes aanwezig zijn.

5. Conclusie en advies

De COGEM heeft in het verleden een generieke milieurisicobeoordeling uitgebracht voor klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen, verkregen met een retro- of lentivirale vector.^{1,2} Van klinische studies die aan de hierin genoemde voorwaarden voldoen, kan aangenomen worden dat het milieurisico verwaarloosbaar klein is. Met betrekking tot de retrovirale transductie van allogene humane T-cellen in onderhavige aanvraag, stelt de COGEM vast dat de voorgenomen klinische studie voldoet aan de generieke criteria. De COGEM is van oordeel dat de retrovirale vector afdoende moleculair is gekarakteriseerd. Zij acht de kans verwaarloosbaar klein dat er RCR in het toe te dienen product aanwezig is en dat derden aan vrije vectordeeltjes worden blootgesteld. Voorafgaand aan de transductie zijn de T-cellen genetisch gemodificeerd door middel van CRISPR-Cas9. Met betrekking tot deze modificatie, acht de COGEM op basis van de aangeleverde informatie de milieurisico's van mogelijk resterende CRISPR-Cas9 LNP's, mRNA of 'translated protein products' in het medisch product voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij voorgenomen klinische studie met Allo-RevCAR01-T verwaarloosbaar klein zijn.

6. Generieke beoordeling m.b.t. gene-editing van cellen

In de generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen, verkregen met een retro- of lentivirale vector, en in de betreffende Vergunning onder vaste Voorwaarden (VoV), is het gebruik van 'targeted nucleases' voorafgaand aan de transductie, zoals CRISPR-Cas, niet opgenomen. Dit heeft ertoe geleid dat klinische studies die voldoen aan de voorwaarden van de generieke milieurisicobeoordeling, maar ook gebruik maken van gene-editing technieken, alsnog voorgelegd worden bij de COGEM.

Bij een eerdere klinische studie waarbij CRISPR-Cas9 ribonucleoproteïne complexen (RNP's) via electroporatie de T-cel werden ingebracht was de COGEM van oordeel dat het milieurisico van de mogelijke aanwezigheid van residuele RNP's bij het toedienen van het medische product verwaarloosbaar klein was, omdat de RNP's niet onder natuurlijke omstandigheden de cel kunnen worden ingebracht, maar alleen via electroporatie of met behulp van een 'carrier'.

In de onderhavige vergunningaanvraag zijn het Cas9 mRNA en sgRNA ingepakt in LNP's. Deze LNP's kunnen *in vitro* gemakkelijk opgenomen worden door de cel, maar er kunnen geen nieuwe LNP's gevormd worden. Verdere verspreiding van LNP's zal niet optreden. De gg-cellen kunnen buiten het lichaam niet overleven en vormen daardoor geen risico voor mens en milieu.

De COGEM is derhalve van oordeel dat *ex vivo* gene-editing met CRISPR-Cas9 of vergelijkbare 'targeted nucleases'^a in de vorm van mRNA, naakt DNA, of eiwitcomplexen (RNP's), al dan niet ingepakt in LNP's voorafgaand aan de *ex vivo* virale transductie onder de generieke milieurisicobeoordeling kan komen te vallen. Zij adviseert ter aanvulling op de geldende milieurisicobeoordeling voor klinische studies met *ex vivo* retro- of lentiviraal getransduceerde cellen, dat de generieke milieurisicobeoordeling eveneens toegepast kan worden onder de randvoorwaarde dat *ex vivo* gene-editing plaatsvindt met 'targeted nucleases' in de vorm van mRNA, naakt DNA, of eiwitcomplexen (RNP's).

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/BWBR0035072/2024-01-01#Bijlage5> (bezocht 20 februari 2024)
4. COGEM (2023). 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
5. 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
6. Taha EA *et al.* (2022). Delivery of CRISPR-Cas tools for *in vivo* genome editing therapy: Trends and challenges. *J. Control. Release* 342: 345-361
7. Dautzenberg IJC & Hoebe RC (2019). The COGEM formula revisited. Experimental validation of the reduction ratio formula for three lentiviral particles. COGEM onderzoeksrapport CGM/2020-01

^a Onder 'targeted nucleases' worden nucleases verstaan die breuken 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 meganucleases waarbij de herkenning van de klievingssequenties gebaseerd is op een DNA-eiwit interactie.

8. Dautzenberg IJC *et al.* (2021). The stability of envelope-pseudotyped lentiviral vectors. *Gene Ther.* 28: 89-104