

Aan de staatssecretaris van Openbaar Vervoer en Milieu
Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat
De heer Ch.A. Jansen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 13 januari 2025
KENMERK CGM/250113-02
ONDERWERP Advies klinische studie met gg-T-cellen specifiek voor antigenen van solide tumoren

Geachte heer Jansen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag getiteld 'Human Clinical Studies of TCR-T Therapy (Autologous TCR Modified T-Cell Therapy) Targeting Tumour Antigens in Solid Tumours with Specific mutation(s) and Human Leukocyte Antigen (HLA) Genotypes' (IM-MV 24-014_000) van het Amsterdam UMC, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

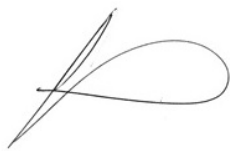
De COGEM is gevraagd om te adviseren over de milieurisico's van een klinische studie waarbij patiënten met solide tumoren behandeld worden met genetisch gemodificeerde (gg-)afweercellen. Voor de klinische studie worden lichaamseigen afweercellen (T-cellen) buiten het lichaam genetisch gemodificeerd met behulp van zogenaamde CRISPR/Cas ribonuclease-complexen. Na de aanpassing worden de gg-T-cellen weer toegediend aan de patiënt.

De CRISPR/Cas ribonuclease-complexen bestaan uit nuclease-eiwitten in combinatie met RNA-sequenties, die samen met DNA-moleculen de T-cel worden ingebracht. Hierdoor wordt de oorspronkelijke receptor die op de T-cel aanwezig is, veranderd in een tumor-specifieke receptor. Door deze modificatie herkennen de gg-T-cellen de tumorcellen en zetten zij een afweerreactie in gang tegen de tumor na toediening aan de patiënt.

Er kan niet worden uitgesloten dat na de modificatie van de T-cellen resterende ribonuclease-complexen aanwezig blijven in de gg-T-cellen of in de suspensie van het medisch product. In celkweek worden de complexen na 48 uur nauwelijks nog waargenomen. In de patiënt zal naar verwachting het afweersysteem de resterende ribonuclease-complexen verwijderen. In het geval dat resterende ribonuclease-complexen aanwezig blijven binnen de gg-T-cellen, zullen deze (gg-)T-cellen niet buiten het lichaam kunnen overleven. Het bovenstaande in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat de risico's voor het milieu bij het uitvoeren van deze 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
- Drs. K.E. Kok, Ministerie van VWS
- Drs. W.T. Leijs, Ministerie van VWS

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is COGEM lid dr. A.T. Das niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Klinische studie met autologe gg-T-cellen specifiek voor neo-antigenen van solide tumoren, die zijn aangepast met behulp van CRISPR/Cas

COGEM advies CGM/250113-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag (IM MV 24-014) voor een klinische studie met genetisch gemodificeerde (gg-)T-cellen ter behandeling van solide tumoren met specifieke mutaties. De aanvraag is afkomstig van het Amsterdam UMC. In de klinische studie zijn lichaamseigen T-cellen (autoloog) buiten het lichaam (*ex vivo*) gemodificeerd met behulp van CRISPR/Cas ribonucleoproteïne complexen (RNP's), waardoor de endogene T-cel receptor (TCR) is uitgeschakeld en een therapeutische TCR is ingebracht in het genoom. De therapeutische TCR kan specifieke neo-antigenen herkennen die in de solide tumoren van de proefpersonen tot expressie komen. De klinische studie heeft als doel het testen van de veiligheid, verdraagbaarheid en effectiviteit van deze therapie, die ANOC-001 is genoemd.

2. Samenstelling en productie van de gg-T-cellen (ANOC-001)

Het medisch product bestaat uit autologe T-cellen die *ex vivo* zijn gemodificeerd met behulp van CRISPR/Cas RNP's. De modificatie van de T-cellen is gericht op het vervangen van de T-cel receptor (TCR), waardoor deze specifieke neo-antigenen (KRAS G12V mutaties) herkent die op de tumor van de proefpersonen voorkomen. Bij de *ex vivo* modificatie van de T-cellen worden middels electroporatie de verschillende componenten van het CRISPR/Cas complex aan de T-cellen van patiënten toegediend. Dit CRISPR/Cas complex bestaat uit het Cas-nuclease, het 'single guide RNA' (sgRNA) en de doggybone-DNA (dbDNA)-'repair template' dat voor de therapeutische TCR codeert. Het Cas-nuclease met het 'single guide RNA' (sgRNA) is gericht op het creëren van een dubbelstrengs breuk in de TCR α locus (TRAC). Bij de reparatie van deze breuk (door middel van 'homology-directed DNA repair') wordt vervolgens de dbDNA-repair template ingebouwd. De dbDNA-repair template bestaat uit een covalent-gesloten lineair dubbelstrengs DNA-construct.¹ Het dbDNA bevat naast de sequentie van het gen voor de therapeutische TCR ook de sequentie voor een ingekort CD34 (CD34t). Het CD34t-eiwit is niet functioneel en wordt gebruikt als markereiwit voor de opzuivering van de gg-T-cellen.² Het dbDNA heeft geen eigen promotor, maar staat na integratie onder controle van de endogene TRAC-promoter. In een als vertrouwelijk bestempeld onderdeel van de vergunningaanvraag, dat is ingezien door de COGEM, worden de RNP's en DNA-repair templates nader gespecificeerd.

3. Opzet van de klinische studie

Er zullen voor de klinische studie maximaal 100 proefpersonen behandeld worden met de autologe gg-T-cellen. Het onderzoek zal plaatsvinden in het Amsterdam UMC. De productie van de gg-T-cellen valt buiten deze aanvraag. De gg-T-cellen zullen intraveneus worden toegediend aan de proefpersoon. Tijdens alle handelingen met de gg-cellen (restitutie, toediening, etc.) worden standaardhygiënemaatregelen in acht genomen. De gg-T-cellen worden getransporteerd in lek- en

breekvaste containers. Al het afval wordt vernietigd volgens biohazard-afvoerprocedures die gelden voor het ziekenhuis.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft eerder 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.³ Tevens heeft de COGEM positief geadviseerd over twee klinische studies met allogene gg-T-cellen die *ex vivo* genetisch gemodificeerd waren met behulp van CRISPR-Cas9 RNP-complexen, waarna de cellen behandeld werden met lentivirale- of adeno-associated virus (AAV)-vectoren.^{4,5}

Daarnaast heeft de COGEM een advies uitgegeven over de risico's voor derden bij klinische studies met gg-T-cellen.^{6,7} Naar aanleiding van dit advies worden eventuele mensgebonden risico's van donatie van lichaamsmateriaal, zwangerschap, het geven van borstvoeding en moedermelkdonatie niet meer onder de vergunningverlening van gg-organismen (ggo's) beoordeeld en geadresseerd.^{7,8}

5. Overweging

5.1 Moleculaire karakterisering

De COGEM heeft criteria opgesteld waaraan de moleculaire karakterisering van een ggo moet voldoen, bij een introductie in het milieu voor een klinische of veterinaire studie.⁹ Hierin staat dat de genetische wijzigingen door middel van sequentiebepaling vastgesteld moeten zijn. Hierbij dient de sequentieanalyse de regio van de beoogde wijziging te omvatten, tot in de flankerende sequenties van het genoom van het uitgangsgenoom.

Het medisch product ANOC-001 bestaat uit lichaamseigen T-cellen die *ex vivo* gemodificeerd zijn met CRISPR/Cas RNP's en een dbDNA-repair template. De sequentie van de dbDNA-repair template is bepaald en geverifieerd. Tevens is de zuiverheid van het sgRNA gecontroleerd. De gg-T-cellen worden na modificatie geselecteerd met behulp van de CD34t marker afkomstig van de dbDNA-repair template. De sequentie van het uiteindelijke product, de gg-T-cellen, wordt niet gecontroleerd. Hierdoor kan er niet met zekerheid gesteld worden dat de gg-T-cellen de beoogde genetische modificaties bezitten. Gezien T-cellen buiten de gastheer niet kunnen overleven, is de COGEM van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat deze beperking in de moleculaire karakterisering van de gg-T-cellen van invloed zal zijn op de milieurisico-analyse.

De COGEM is van oordeel dat zowel het sgRNA en de dbDNA-repair template als het medisch product ANOC-001 voldoende moleculair gekarakteriseerd zijn.

5.2 Het optreden van recombinatie met virale sequenties

DNA-repair templates waarin meerdere transgenen achter één promotor zijn geplaatst, bevatten meestal virale '2A' sequenties afkomstig van de *Picornaviridae* of *Permutotetraviridae* teneinde de genen tot expressie te kunnen brengen. De vier meest gebruikte 2A-sequenties zijn afkomstig van de diervirussen *Aphthovirus burrowsi*, *Teschovirus asilesi*, *Aphthovirus vesiculae* (Foot-and-mouth disease virus) en *Alphapermutotetravirus thosae*.¹⁰ Omdat de DNA-repair templates bij *ex vivo* genetische modificatie ingebouwd worden in het

genoom van de gg-cellen, kunnen de ontstane cellen zeer korte virale sequenties bevatten die coderen voor virale 2A peptiden. De kans op homologe recombinatie tussen bovengenoemde virussen en virale sequenties in het DNA genoom van de gg-T-cel of tussen de virussen en de DNA 'repair template' is verwaarloosbaar klein, omdat deze virussen over een positief RNA-genoom bezitten wat niet met DNA zal recombineren.

5.3 Aanwezigheid van residuele RNP's en DNA-repair templates in het medisch product

Voor de productie van het medisch product ANOC-001 worden autologe T-cellen *ex vivo* geëlectroporeerd, waarmee CRISPR/Cas RNP's en een dbDNA-repair template in de cellen worden geïntroduceerd. Bij het electroporeren van de T-cellen kunnen losse CRISPR/Cas-componenten buiten de cel achterblijven. Ook kunnen residuele RNP's en DNA-repair templates aanwezig blijven in de gg-T-cellen zelf. In theorie zouden hierdoor residuele CRISPR/Cas-componenten mee kunnen komen bij het toedienen van het medisch product aan de patiënt.

5.3.1 Aanwezigheid van residuele CRISPR/Cas componenten in de gg-T-cellen

Een doggybone-DNA-repair template is naakt DNA, en zal naar verwachting vergelijkbaar met plasmide DNA niet lang in de gg-T-cellen aanwezig blijven. Naakt plasmide-DNA heeft in het cytoplasma van *ex vivo* gecultiveerde humane cellen een halfwaardetijd tussen de 50 minuten en 5 uur.¹¹ RNP's zijn na 24 uur in *ex vivo* gecultiveerde cellen nog nauwelijks detecteerbaar, en na 48 uur niet meer aan te tonen via 'Western blotting'.¹² In de aanvraag is niet gespecificeerd hoe lang de kweekperiode van de gg-T-cellen is, voordat zij aan de patiënt worden toegediend. Daarnaast zijn er geen gegevens bekend bij de COGEM over de halfwaardetijd van doggybone DNA in humane cellen. In het geval dat residuele RNP's en DNA-repair templates aanwezig blijven in de gg-T-cellen zullen deze (gg-)T-cellen zich niet buiten het lichaam kunnen handhaven en worden ze niet uitgescheiden via speeksel, urine of feces.

In het onwaarschijnlijke geval dat de gg-T-cellen terecht zouden komen in derden, worden de gg-T-cellen als lichaamsvreemd aangemerkt en vernietigd door een verschillend HLA profiel. Alleen in het geval van een overeenkomstig HLA profiel zullen de gg-T-cellen niet als lichaamsvreemd aangemerkt worden. In dit geval moet een derde een tumor hebben met dezelfde mutatie als de proefpersoon voor een afweerreactie door de gg-T-cellen op gang zou komen. De COGEM is van oordeel dat de risico's van de aanwezigheid van residuele CRISPR/Cas-componenten in de gg-T-cellen voor derden verwaarloosbaar klein zijn.

5.3.2 Aanwezigheid van residuele CRISPR/Cas componenten in de suspensie van het medisch product

Indien er residuele CRISPR/Cas-componenten meekomen bij het toedienen van het medisch product aan de patiënt, zullen deze CRISPR/Cas-componenten waarschijnlijk door het afweersysteem van de ontvanger als lichaamsvreemd worden aangemerkt en verwijderd. In het geval van het veelgebruikte CRISPR-Cas9-eiwit, zijn er reeds bestaande antilichamen tegen Cas9-eiwitten gevonden (vermoedelijk verkregen via blootstelling aan bacteriële Cas9-varianten) en humorale afweerreacties waargenomen in gezonde personen.^{13,14,15} Gegevens uit een onderzoek in niet-menselijke primaten, honden en muizen laten zien dat er naast bestaande antilichamen tegen Cas9-eiwitten ook bestaande antilichamen tegen Cas12-eiwitten zijn gevonden.¹⁶ Als via de suspensie van het medisch product naakt DNA (dbDNA) aan de

patiënt wordt toegediend zal dit DNA via de normale opruimingsmechanismes van het lichaam worden verwijderd.

In het onwaarschijnlijke geval dat de componenten van het CRISPR/Cas complex in het medisch product aanwezig zijn en het medisch product in het milieu of een derde terechtkomt, bijvoorbeeld bij prikaccidenten, kunnen deze alleen via electroporatie of een 'carrier' de cel worden ingebracht. Onder natuurlijke omstandigheden komt dit niet voor.

De COGEM is van mening dat er niet kan worden uitgesloten dat er losse RNP's of DNA-repair templates aanwezig zijn in het medisch product. De kans dat deze componenten gedurende langere tijd aanwezig zijn in de patiënt, acht de COGEM verwaarloosbaar klein. Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor het milieu bij een klinische studie met gg-T-cellen die mogelijk residuele RNP's en/of DNA-repair templates bevatten, verwaarloosbaar klein zijn.

6. Advies

Het medisch product ANOC-001 bestaat uit lichaamseigen T-cellen die *ex vivo* gemodificeerd zijn met CRISPR/Cas RNP's en dbDNA-repair templates. Er kan niet worden uitgesloten dat er residuele RNP's of dbDNA-repair templates aanwezig zijn in het medisch product. De kans dat deze componenten voor langere tijd aanwezig zijn in de patiënt, en dat de CRISPR/Cas-componenten risico's voor derden vormen, acht de COGEM verwaarloosbaar klein. De gg-T-cellen zelf kunnen zich niet handhaven buiten het lichaam en kunnen zich niet verspreiden.

Op basis van het bovenstaande, is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met autologe gg-T-cellen die *ex vivo* gemodificeerd zijn met behulp van CRISPR/Cas RNP's en dbDNA-repair templates, verwaarloosbaar klein zijn.

7. Signalerende opmerking

De COGEM heeft eerder opgemerkt dat gg-T-cellen kunnen worden overgedragen aan derden door donatie van lichaamsmateriaal, zwangerschap, het geven van borstvoeding en moedermelkdonatie.⁷ Destijds is besloten dat deze risico's niet meer onder de vergunningverlening van ggo's worden beoordeeld en geadresseerd.^{7,8} De COGEM wijst erop dat de instanties die betrokken zijn bij donatie van lichaamsmateriaal zich bewust moeten zijn van de mogelijke overdrachtsrisico's en geïnformeerd moeten worden over de behandeling die patiënten hebben ondergaan, zodat zij dit in hun overwegingen mee kunnen nemen.

Referenties

1. Karbowniczek K *et al.* (2017). Doggybone™ DNA: an advanced platform for AAV production. *Immuno-oncol. insights*
2. Moore T *et al.* (2018). Clinical and immunologic evaluation of three metastatic melanoma patients treated with autologous melanoma-reactive TCR-transduced T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 67: 311-325
3. 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

4. COGEM (2020). Klinische studie met allogene *ex vivo* recombinant AAV-vector getransduceerde T-cellen (CTX130). COGEM advies CGM/201029-01
5. COGEM (2023) Advies klinische studie met WU-CART-007. COGEM advies CGM/230207-01
6. COGEM (2019). Immunotherapie met genetisch gemodificeerde T-cellen: onbedoelde blootstelling en potentiële risico's. COGEM signalering CGM/190227-01
7. COGEM (2020). Beoordeling van risico's voor derden bij gentherapiestudies met replicatie-deficiënte ggo's en gg-T-cellen. COGEM advies CGM/2000123-01
8. Minister van Infrastructuur en Waterstaat (2020). Beleidsnota Biotechnologie 27428, nr. 366. <https://zoek.officielebekendmakingen.nl/kst-27428-366.html> (bezocht op 9 december 2024)
9. COGEM (2013). Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing. COGEM advies CGM/130227-05
10. Kim JH *et al.* (2011). High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PloS one* 6: e18556.
11. Vaughan EE *et al.* (2006). Intracellular trafficking of plasmids for gene therapy: mechanisms of cytoplasmic movement and nuclear import. *Curr. Gene Ther.* 6: 671–681
12. 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
13. Charlesworth CT *et al.* (2019). Identification of pre-existing adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat. Med.* 25: 249–254
14. Simhadri VL *et al.* (2018). Prevalence of Pre-existing Antibodies to CRISPR-Associated Nuclease Cas9 in the USA Population. *Mol. Ther. Methods. Clin. Dev.* 10: 105–112
15. Wagner DL *et al.* (2019). High prevalence of *Streptococcus pyogenes* Cas9-reactive T cells within the adult human population. *Nat. Med.* 25: 242–248
16. Xiao P *et al.* (2019). Extensive adaptive immune response of AAVs and Cas proteins in non-human primates. *BioRxiv* 588913