

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 20 mei 2025
KENMERK CGM/250520-01
ONDERWERP Advies Aanpassing grenswaarde vrije vectordeeltjes bij gentherapie met gg-cellen

Geachte heer Jansen,

De COGEM heeft de eerder gehanteerde grenswaarden voor aanwezige vrije vectordeeltjes in het medische product van klinische studies waarbij patiënten behandeld worden met *ex vivo* getransduceerde cellen, heroverwogen. De COGEM deelt u hierover het volgende mee.

Samenvatting:

Bij bepaalde gentherapieën worden cellen van een patiënt buiten het lichaam genetisch aangepast. Voor de aanpassing wordt vaak gebruik gemaakt van zogenaamde retro- of lentivirale vectordeeltjes. Deze vectordeeltjes worden na het aanpassen van de cellen veelal weggewassen, waarna de aangepaste cellen teruggebracht worden in de patiënt. Er kan echter niet altijd uitgesloten worden dat er toch nog vectordeeltjes aanwezig zijn bij toediening. De aanwezigheid van vectordeeltjes vormt een potentieel risico wanneer bij een incident derden hieraan worden blootgesteld. Hierbij kan niet uitgesloten worden dat cellen ontregeld raken, wat mogelijk tot kanker kan leiden. Het aantal vectordeeltjes dat onbedoeld overgedragen kan worden, speelt daarom een belangrijke rol in de milieurisico-beoordeling. Het aantal vectordeeltjes dat nog aanwezig is in de terug te plaatsen cellen kan experimenteel worden bepaald of met de 'COGEM-formule' worden berekend. De COGEM heeft eerder een grenswaarde geadviseerd voor het aantal aanwezige vectordeeltjes, op basis waarvan bepaald wordt of aanvullende maatregelen nodig zijn om de kans op overdracht van vectordeeltjes naar derden tot een minimum te beperken. In dit advies evalueert zij deze grenswaarde en adviseert zij om deze aan te passen. De COGEM is van oordeel dat bij een maximale hoeveelheid van 500 retro- of lentivirale vectordeeltjes in de terug te plaatsen cellen, de risico's voor derden 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

Advies Heroverweging grenswaarde aanwezige vrije lenti- en retrovirale vectordeeltjes bij klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen

COGEM-advies CGM/250520-01

1. Inleiding

Onderzoek naar het gebruik van genetisch gemodificeerde (gg-)cellen in gentherapiestudies heeft het afgelopen decennium een vogelvlucht genomen. Bij dergelijke therapieën worden lichaamscellen (meestal bloed(stam)cellen) bij een patiënt of donor afgenomen, buiten het lichaam (*ex vivo*) genetisch gemodificeerd en vervolgens teruggebracht in de patiënt. Voor de genetisch modificatie (transductie) worden virale vectoren gebruikt die afgeleid zijn van lentivirussen en retrovirussen. Deze lenti- en retrovirale vectoren kunnen een therapeutisch gen laten integreren in het genoom van de gastheercel. Na de transductie ondergaan de gg-cellen veelal diverse kweek- en wasstappen, met mede als doel de overmaat aan ‘vrije’ (niet in de cel geïnternaliseerde) vectordeeltjes te verwijderen. Er kan echter niet altijd uitgesloten worden dat er toch nog vrije vectordeeltjes aanwezig zijn in de terug te brengen gg-cellen (het medisch product).

Deze vrije vectordeeltjes worden als een risicofactor gezien, omdat verspreiding naar derden (omstanders, zoals familie) tot onbedoelde transductie zou kunnen leiden. Hierdoor zou het transgen in cellen van de ontvanger ongewenst tot expressie kunnen komen. Ook kan niet uitgesloten worden dat gezonde cellen ontregeld raken, wat in het ernstigste geval tot kanker zou kunnen leiden.

De hoeveelheid deeltjes die bij onbedoelde blootstelling overgedragen worden, speelt een belangrijke rol bij de milieurisicobeoordeling.^{1,2,3} Om een inschatting te krijgen van de hoeveelheid retro- of lentivirale vectordeeltjes in het medische product kan een experimentele of theoretische benadering gebruikt worden. Met behulp van een gevalideerde test kan experimenteel aangetoond worden dat het aantal vrije vectordeeltjes teruggebracht is tot een verwaarloosbare concentratie. Het aantal aanwezige vectordeeltjes kan ook met de ‘COGEM-formule’ worden berekend.^{4,5} Bij de berekening heeft de COGEM een bepaalde grenswaarde geadviseerd,^{1,6} op basis waarvan bepaald wordt of er aanvullende beheersmaatregelen nodig zijn om de kans op overdracht van vrije vectordeeltjes van de patiënt naar derden tot een minimum te beperken.

Inmiddels is er een groot aantal aanvragen voor klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen geweest, waarover de COGEM heeft geadviseerd. De COGEM heeft besloten om de risico's van overdracht van vrije vectordeeltjes in dit advies nogmaals tegen het licht te houden en de eerder gehanteerde grenswaarde van de maximaal toelaatbare aanwezige vrije vectordeeltjes te evalueren.

2. COGEM adviezen over klinische studies met retro- en lentiviraal getransduceerde cellen

De COGEM heeft in 2019 en 2020 een generieke milieurisicobeoordeling uitgebracht betreffende klinische studies met *ex vivo* retro- en lentiviraal getransduceerde cellen in afwezigheid van vrije vectordeeltjes,¹ en *ex vivo* lentiviraal getransduceerde cellen in aanwezigheid van vrije lentivirale vectordeeltjes in het medisch product.² De generieke milieurisicobeoordeling is van toepassing

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.

In de generieke milieurisicobeoordelingen worden verscheidene randvoorwaarden genoemd waaraan het ggo(-product) dient te voldoen om tot een verwaarloosbaar klein milieurisico te komen. Deze zijn door voortschrijdend inzicht verscheidene keren herzien.^{3,7,8} Eén van de voorwaarden betreft de afwezigheid van vrije vectordeeltjes in het medische product. Met betrekking tot klinische studies die gebruik maken van VSV-G gepseudotyperde lentivirale vectoren heeft de COGEM enkele generieke beheersmaatregelen geadviseerd wanneer de aanwezigheid van lentivirale vectordeeltjes niet uitgesloten kan worden:

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

Deze beheersmaatregelen zijn gebaseerd op een 'worst case'-scenario waarbij er geen afname van vrije vectordeeltjes heeft plaatsgevonden en er maximaal 10^{12} vectordeeltjes aanwezig zijn in het medisch product.² Op basis van het bloedvolume van de gemiddelde patiënt en de inactivatie van de vectordeeltjes door (o.a.) het complementsysteem, is berekend dat het aantal vectordeeltjes in het bloed van de patiënt na circa 12 uur dermate zal zijn gereduceerd dat bij eventuele overdracht naar derden een verwaarloosbaar kleine hoeveelheid vectordeeltjes zal worden overgedragen. Uit voorzichtigheidsoverwegingen heeft de COGEM geadviseerd een ruimere veiligheidsmarge in acht te nemen en de patiënt minimaal 16 uur in het ziekenhuis op te nemen, zodat de geëigende ziekenhuishygiënische maatregelen in acht genomen kunnen worden om de kans op verspreiding in te perken.

2.1 De COGEM-formule

Om een inschatting te maken van het aantal vectordeeltjes dat nog aanwezig is in het medische product (de gg-cellen), kan de COGEM-formule worden gebruikt. Oorspronkelijk is de COGEM-formule ontwikkeld ten behoeve van de risicobeoordeling van laboratoriumwerkzaamheden met replicatie-deficiënte VSV-G gepseudotyperde lentivirale vectoren (Ingeperkt Gebruik), in het bijzonder voor werkzaamheden met lentiviraal getransduceerde hechtende cellen.⁴ De formule wordt echter ook toegepast bij het beoordelen van aanvragen voor klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen.^{1,9,10,11} Hierbij wordt zowel de aanwezigheid (of afwezigheid) berekend van vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes, alsook van retrovirale vectordeeltjes.

Met de COGEM-formule wordt een reductieratio berekend van het aantal vrije vectordeeltjes: het verlies aan infectieuze titer van vrije vectordeeltjes op basis van een aantal inactiverende activiteiten. Hierbij wordt rekening gehouden met het natuurlijke verval van de vectordeeltjes (halfwaardetijd), de

inactivatie door trypsine e.d. en het verlies aan deeltjes door het wassen of passeren van de gekweekte cellen. Deze inactiverende stappen worden gerelateerd aan de totale hoeveelheid infectieuze deeltjes in het voor de transductie gebruikte inoculum. In 2020 hebben onderzoekers in opdracht van de COGEM voor bepaalde aannames een experimentele onderbouwing gezocht en zijn (onder andere) gegevens verzameld over de stabiliteit van de lentivirale vectordeeltjes.^{2,5}

De COGEM-formule is als volgt:

$$\text{Reductieratio} = (20^W \times 200^I \times 2^{F \times T}) / C_i$$

Hierin zijn **W** het aantal wasstappen, **I** het aantal inactiverende wasstappen met trypsine, en **T** de kweektijd in dagen (etmalen) na transductie. De factor **F** is de reductiefactor naar aanleiding van de halfwaardetijd van het vectordeeltje, en wordt berekend door het getal 24 (het aantal uren in een etmaal) te delen door de halfwaardetijd (in uren) van het vectordeeltje ($T_{1/2}$). Deze waarde is sterk afhankelijk van het gebruikte pseudotyperingseiwit.⁵ **C_i** is het oorspronkelijke aantal infectieuze vectordeeltjes in het inoculum.

Het reducerende effect van wasstappen is onder andere afhankelijk van de grootte van de gebruikte kweekschalen. Zo wordt bij gebruik van een kweekschaal met een diameter van 10 cm de constante waarde '20' gehanteerd, overeenkomstig met een reductie van 95%.⁵ Als additionele reductiefactor voor een inactiverende wasstap met trypsine, wordt de waarde 10 aangehouden. Gecombineerd met de wasstap is hiervoor de waarde ($10 \times 20 =$) 200 opgenomen in de formule. Deze waarde is echter afhankelijk van het gebruikte pseudotyperingseiwit.⁵

Wanneer uit de formule een reductieratio van 1 volgt, geeft dit aan dat de hoeveelheid aanwezige vrije infectieuze virusdeeltjes is verminderd tot 1. Een reductieratio van 100 geeft aan dat er gemiddeld 1/100 = 0,01 infectieuze deeltjes achterblijven in de celcultuur.

2.2 Huidige grenswaarden van het aantal vrije vectordeeltjes

Bij klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen, worden deze via een infuus in de bloedbaan van de patiënt ingebracht. Wanneer er vrije infectieuze vectordeeltjes in het medisch product aanwezig zijn, kunnen deze in het geval van incidenten naar derden verspreiden. De meest waarschijnlijke route waarlangs derden aan vectordeeltjes zouden kunnen worden blootgesteld, is via bloed-bloedcontact met de patiënt. De vrije vectordeeltjes kunnen bij de ontvanger leiden tot transductie van cellen. Naast dat deze cellen het door de vector gecodeerde genproduct kunnen gaan produceren, kan dit leiden tot insertionele oncogenese. Dit betreft het proces waarbij het door de integratie van het vectorgenoom in het DNA van de lichaamscellen tumorsuppressorgenen geïnactiveerd, of proto-oncogenen geactiveerd worden, waardoor ongecontroleerde celgroei of kanker kan ontstaan.

Om de kans op onbedoelde blootstelling van derden aan vrije vectordeeltjes te minimaliseren, hanteert de COGEM een grenswaarde voor het aantal aanwezige vrije vectordeeltjes in het medische product. Voor gammaretrovirale (op MoMLV gebaseerde) vectordeeltjes wordt een reductieratio van minimaal 100 (i.e., 1/100 = maximaal 0,01 vectordeeltje in het medisch product) gehanteerd.¹ Voor SIN-lentivirale vectordeeltjes gepseudotyperd met VSV-G heeft de COGEM een reductieratio van 1 (i.e., 1/1

= maximaal 1 vectordeeltje in het medisch product) geadviseerd.⁶ Wanneer de reductieratio niet wordt gehaald, dienen de eerder door de COGEM geadviseerde beheersmaatregelen gehanteerd te worden.

Het verschil in reductieratio tussen beide type vectoren is destijds gebaseerd op de kans op het optreden van insertionele oncogenese. Dit is in het verleden voornamelijk gerapporteerd bij experimenten en klinische studies waarbij gebruik gemaakt werd van retrovirale vectoren afgeleid van MoMLV. De kans op insertionele oncogenese werd voor lentivirale vectoren kleiner geacht door aanwezigheid van de SIN-deletie in deze vectoren.² Echter, recent is ook bij het gebruik van SIN-lentivirale vectoren insertionele oncogenese waargenomen.¹²

3. Heroverweging van de grenswaarden van het aantal vrije vectordeeltjes

In 2019 hebben de nationale bevoegde autoriteiten ('competent authorities') van de EU-lidstaten in samenwerking met de 'Commission services' een generiek 'Good practice document' opgesteld voor gentherapiestudies met *ex vivo* getransduceerde cellen.^{13,14} Op basis van het 'Good practice document' en eerdere milieuriscobeoordelingen van de COGEM,^{1,2,3} is in Nederland een vergunning onder vaste voorwaarden (VoV) voor dergelijke studies opgesteld, waarmee vergunningaanvragen via een vereenvoudigde en verkorte procedure afgehandeld kunnen worden.^{10,11} In deze document zijn verschillende vereisten opgesteld waaraan de vectoren en gg-cellen moeten voldoen. Eén van deze vereisten betreft de afwezigheid van vrije vectordeeltjes in het medisch product. Deze vrije vectordeeltjes worden als een risicofactor gezien vanwege het eerdergenoemde risico op insertionele oncogenese. In het 'Good practice document' wordt verwezen naar de COGEM-formule als hulpmiddel voor een theoretische benadering van het aantal resterende vectordeeltjes in het medische product.

De COGEM heeft over een groot aantal klinische studies geadviseerd. In sommige gevallen blijkt uit gebruik van de COGEM-formule dat er lage aantallen vrije vectordeeltjes aanwezig zijn. De COGEM wijst erop dat de COGEM-formule een zo goed mogelijke benadering geeft van de hoeveelheid vectordeeltjes. Het daadwerkelijke aantal vectordeeltjes kan echter afwijken en is afhankelijk van de specifieke kweek- en wascondities die gebruikt zijn. Daarnaast wordt in de formule geen rekening gehouden met het verlies aan deeltjes door de opname in cellen (de transductie). De COGEM merkt verder op dat de aanwezigheid van kleine aantallen vrije vectordeeltjes in het medische product geen risico hoeft te vormen. Wanneer rekening gehouden wordt met een verdunning na toediening in de bloedbaan van de patiënt, en het beperkte bloedvolume dat betrokken zal zijn bij een eventueel incident, zal het uiteindelijke risico bij eventuele blootstelling ook bij kleine aantallen vrije vectordeeltjes verwaarloosbaar klein zijn. Gezien het voorgaande heeft de COGEM in dit advies de grenswaarden van het aantal vrije vectordeeltjes geëvalueerd, waarbij rekening gehouden wordt met de kans dat er daadwerkelijk nog vrije vectordeeltjes aanwezig zijn in het overgedragen bloedvolume.

Het medische product, met eventueel aanwezige vrije vectordeeltjes, wordt via de bloedbaan aan de patiënt toegediend. De meest waarschijnlijke route waarlangs een derde aan vectordeeltjes zou kunnen worden blootgesteld is via bloed-bloed contact. Indien na toediening van de gg-cellen aan de patiënt door accidenteel bloed-bloed contact tussen patiënt en derden (zoals familie) overdracht van vectordeeltjes plaats zou vinden, heeft de COGEM eerder ingeschat dat het maximaal overgedragen volume 100 µl zal zijn.² Wanneer voor dit volume de eerder gehanteerde veiligheidsmarge van maximaal 0,01 vectordeeltjes gehanteerd wordt en er daarnaast vanuit gegaan wordt dat het

gemiddelde totale bloedvolume van de patiënt 5 liter bedraagt, mag de suspensie met gg-cellen die toegediend wordt aan de patiënt maximaal 500 vectordeeltjes bevatten (overeenkomstig met een reductieratio van minimaal 0,002). Hierbij acht de COGEM het niet meer noodzakelijk onderscheid te maken tussen gammaretro- of lentivirale vectordeeltjes. Enkel bij aanwezigheid van meer dan 500 vectordeeltjes in het medische product, dienen de eerder geadviseerde ziekenhuisopname maatregelen (opname van minimaal 16 uur) gehanteerd te worden (zie paragraaf 2), tenzij de aanvrager aannemelijk kan maken dat de vectordeeltjes eerder voldoende uit het lichaam van de patiënt geklaard zijn.

4. Advies

De COGEM heeft in dit advies de milieurisico's van overdracht van vrije retro- en lentivirale vectordeeltjes naar derden bij gentherapiestudies met gg-cellen tegen het licht gehouden. De COGEM is van oordeel dat bij een reductieratio van minimaal 0,002 (overeenkomstig met maximaal 500 vrije vectordeeltjes) de kans op een schadelijk effect door accidentele overdracht verwaarloosbaar klein is. Indien aan deze grenswaarde wordt voldaan, is de COGEM van oordeel dat de risico's van de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes in het medische product bij klinische studies met *ex vivo* retro- en lentiviraal getransduceerde cellen, verwaarloosbaar klein zijn. Indien deze grenswaarde niet bereikt kan worden, dienen de eerder geadviseerde maatregelen m.b.t. ziekenhuisopname van 16 uur gehanteerd te worden, tenzij de aanvrager aannemelijk maakt dat de vectordeeltjes eerder voldoende uit het lichaam van de patiënt geklaard zijn.

In Nederland kunnen vergunningaanvragen voor klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen via een vereenvoudigde procedure behandeld worden wanneer zij aan bepaalde randvoorwaarden voldoen.^{10,11} Op het moment wordt hierbij onderscheid gemaakt tussen studies met retro- of lentivirale vectoren waarbij géén vrij vectordeeltjes aanwezig zijn in het medische product, en klinische studies met SIN-lentivirale vectoren waarbij nog vrije vectordeeltjes in het medisch product aanwezig kunnen zijn. De COGEM adviseert om ook in deze VoV's de nieuwe grenswaarde te hanteren.

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). 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
3. 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
4. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. COGEM advies CGM/090331-03
5. Dautzenberg IJC & Hoebe RC (2020). The COGEM formula revisited. Experimental validation of the reduction ratio formula for free lentiviral particles. COGEM rapport CGM 2020-01
6. COGEM (2018). Vrije virusdeeltjes in klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen (JCAR017) tegen B-cel maligniteiten. COGEM advies CGM/180702-01
7. COGEM (2024). Generiek advies over elementen in lenti- en retrovirale vectoren. COGEM advies CGM/240612-01
8. COGEM (2025). Advies virale promotorsequenties in lenti- en retrovirale vectoren. COGEM advies CGM/250122-01
9. European Commission. Advanced therapies. https://health.ec.europa.eu/medicinal-products/advanced-therapies_en (bezoekt: 24 april 2025)

10. Loket Gentherapie (RIVM). Aanvraagformulier Retro/lentivirale vectoren zonder deeltjes – VoV. <https://www.loketgentherapie.nl/aanvraagformulier-retrovirale-vectoren-vov> (bezocht: 24 april 2025)
11. Loket Gentherapie (RIVM). Aanvraagformulier Lentivirale vectoren en SIN virale partikels – VoV https://www.loketgentherapie.nl/aanvraagformulier-cellen_LLIV-SIN_met_deeltjes-vov (bezocht: 24 april 2025)
12. Duncan CN *et al.* (2024). Hematologic cancer after gene therapy for cerebral adrenoleukodystrophy. *N. Engl. J. Med.* 391: 1287-1301
13. European Commission. Advanced therapies. https://health.ec.europa.eu/medicinal-products/advanced-therapies_en (bezocht: 24 april 2025)
14. Good Practice on the assessment of GMO-related aspects in the context of clinical trials with human cells genetically modified. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/advtherapies/docs/gmcells_gp_en.pdf (bezocht: 1 mei 2025)