

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw S.A.M. Dijkma  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

BEZOEKADRES:  
A. VAN LEEUWENHOEKLAAN 9  
3721 MA BILTHOVEN

POSTADRES:  
POSTBUS 578  
3720 AN BILTHOVEN

TEL.: 030 274 2777  
FAX: 030 274 4476  
INFO@COGEM.NET  
WWW.COGEM.NET

**DATUM** 29 februari 2016  
**KENMERK** CGM/160229-01  
**ONDERWERP** Advies Klinische studie lentiviraal getransduceerde T-cellen

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 15-012 met de titel: 'Testing CTL019 in clinical trials with patients with B cell malignancies' van het AMC, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de milieurisico's van een klinische studie in patiënten met B-cel kanker. De patiënten worden behandeld met eigen T-cellen die in het laboratorium genetisch gemodificeerd zijn met behulp van een lentivirale vector. Hierdoor krijgen deze T-cellen een zogenaamde chimere antigen receptor (CAR) op hun celoppervlak die hun in staat stelt de B-cellen te herkennen en te vernietigen.

Risico's die bij deze klinische studie kunnen optreden, hebben met name betrekking op de eventuele vorming en verspreiding van replicatiecompetent lentivirus (RCL), de aanwezigheid van vrije virusdeeltjes in het te testen medische product en de effecten van de mogelijke verspreiding van de gg-T-cellen in het milieu.

De COGEM is van mening dat het productiesysteem waarmee de lentivirale vector wordt geproduceerd zodanig is ontworpen dat de kans op het ontstaan van een replicatiecompetent lentivirus tot een minimum wordt beperkt. Tevens wordt de geproduceerde batch lentivirale vector door de aanvrager getest op de aanwezigheid van RCL. De COGEM acht de kans op de aanwezigheid van RCL in het medische product derhalve verwaarloosbaar klein.

Door de kweek- en wasprocedures die de aanvrager hanteert bij de productie van de gg-T-cellen, worden eventueel aanwezige infectieuze virusdeeltjes zodanig verdund dat de kans dat er nog infectieuze virusdeeltjes in het preparaat zitten op het moment dat het aan de patiënt wordt toegediend, verwaarloosbaar klein is.

Indien de gg-T-cellen door een incident in derden of in het milieu terecht komen, acht de COGEM de kans op nadelige effecten verwaarloosbaar klein. De patiënt-specifieke T-cellen worden in vrijwel alle mensen direct afgestoten en de T-cellen kunnen buiten het lichaam niet overleven.

Op basis van bovenstaande is de COGEM van mening dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen 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. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo  
                  Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

*Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM lid dr. K.C. Wolthers niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies*

# Klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen tegen B-cel maligniteiten

## COGEM advies CGM/160229-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag van het AMC voor een klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen in patiënten met verschillende vormen van B-cel maligniteiten. Deze maligniteiten vormen een heterogene groep van onder andere acute lymfatische leukemie (ALL), chronische lymfatische leukemie (CLL) en non-Hodgkin lymfomen (NHL). De lentivirale vector die in deze studie wordt gebruikt, bevat een expressiecassette voor een chimere anti-CD19 receptor. Door expressie van deze receptor kunnen de getransduceerde T-cellen de maligne B-cellen herkennen en vernietigen. Met deze studie hoopt de aanvrager de veiligheid en efficacy van deze behandelmethode voor verschillende B-cel maligniteiten in kaart te brengen.

#### 1.1. Humoraal immuunsysteem

B-cellen of B-lymfocyten worden in het beenmerg gevormd en zijn onderdeel van het humorale immuunsysteem van gewervelden. In de mens komen verschillende typen B-cellen voor met ieder een unieke B-cel receptor op hun celmembranen.<sup>1</sup> Iedere receptor herkent een specifiek antigeen. Na blootstelling aan een specifiek antigeen worden de B-cellen die dit antigeen herkennen geactiveerd en differentiëren ze in twee verschillende soorten B-cellen. Enerzijds zijn dit plasmacellen, die actief antilichamen produceren en uitscheiden, en anderzijds B-geheugencellen die gedurende lange tijd leven en snel reageren bij een tweede blootstelling aan hetzelfde antigeen.

Het CD19 transmembran eiwit is betrokken bij de signaaltransductie via de B-cel receptor. CD19 komt tot expressie in de B-cellen vanaf de vroege ontwikkeling tot na de differentiatie in een plasmacel. CD19 komt echter niet voor op pluripotente bloedstamcellen en op andere weefsels. Door dit beperkte expressieprofiel vormt CD19 een relatief veilige ‘target’ voor therapeutische interventie in B-cel maligniteiten.

#### 1.2. Lentivirale vectoren

Lentivirale vectoren zijn afgeleid van lentivirussen en behoren tot de familie van retrovirussen (*Retroviridae*, genus *Lentivirus*).<sup>2</sup> Een lentivirusdeeltje bevat twee enkelstrengs RNA kopieën van het virale genoom van ieder circa 9.3 kb. Als basis voor de in deze aanvraag beschreven lentivirale vectoren wordt gebruik gemaakt van het genoom van het *Human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1). Het genoom van HIV-1 heeft aan weerszijden een zogenaamde *Long Terminal Repeat* (LTR). Daarnaast bevat het genoom een ‘packaging’ signaal ( $\Psi$ ), drie structurele genen (*gag*, *pol* en *env*), vier accessoire genen (*vif*, *vpr*, *vpu* en *nef*) en twee regulatoire genen (*tat* en *rev*).<sup>3</sup>

Voor de productie van de lentivirale vectoren worden de verschillende virusfuncties opgesplitst en verdeeld over verschillende plasmiden. Deze plasmiden moeten gezamenlijk in een gastheercel getransfecteerd worden om virusdeeltjes te kunnen produceren.<sup>3,4</sup> Door deze opsplitsing wordt de kans op het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus (RCL) tijdens de productie van lentivirale vectoren

gereduceerd en neemt de bioveiligheid toe. Met het oog op deze bioveiligheid zijn in de loop van de tijd verschillende generaties van productiesystemen ontwikkeld.

Naast de verbeteringen aan het productiesysteem, is de bioveiligheid van het lentivirale vectorsysteem ook verbeterd door de ontwikkeling van zelf-inactiverende vectoren.<sup>5,6</sup> Uit deze zogenaamde SIN vectoren is een deel van de 3'LTR verwijderd. Dit reduceert de kans op mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheer aanzienlijk.

Van nature infecteert HIV-1 de verschillende cellen van het immuunsysteem zoals T-lymfocyten, macrofagen en monocytten. Voor een bredere toepasbaarheid van lentivirale vectoren wordt het gastheerbereik meestal uitgebreid door pseudotypering van de lentivirale deeltjes met een oppervlakte eiwit van het *Vesicular stomatitis virus* (VSV-G).

### 1.3. Het medische product

CTL019 bestaat uit, autologe T cellen die *ex vivo* getransduceerd zijn met een lentivirale vector. De lentivirale vector is een zogenaamde SIN vector en is gepseudotypeerd met VSV-G. De vector bevat een minimum aan lentivirale sequenties. Het betreft self-inactivating LTR's, het packagingsignaal ( $\Psi$ ), het Rev Response element (RRE) en de polypurine tract (PPT). Deze sequenties zijn nodig voor packaging van het vectorgenoom in het virusdeeltje en reverse transcriptie en integratie van het vectorgenoom in de gastheer cel.

Daarnaast bevat de vector een expressiecassette voor een chimere antigen receptor (CAR), die gericht is tegen het CD19 eiwit. De CAR bestaat uit vier verschillende onderdelen. Extracellulair bevindt zich een muizen 'single chain antibody fragment' (scFv) dat gericht is tegen CD19. Daarnaast bevat het een humaan CD8 $\alpha$  transmembraan domein. Het deel van de CAR dat intracellulair is gelegen, bevat een humaan 4-1BB en een CD3 $\zeta$  intracellulair signaal domein.<sup>7,8</sup> De expressiecassette bestaat verder uit de promotor van de humane elongatie factor 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) en een gemodificeerde versie van het Woodschuck hepatitis virus post-transcriptionele regulatoire element (WPRE).

Na infectie van de T-cellen door de lentivirale vector komt CAR in deze cellen tot expressie waardoor de getransduceerde T-cellen specifiek B-cellen herkennen en elimineren.

### 1.4. Productie van de lentivirale vector

De lentivirale vector die gebruikt wordt voor de transductie van de autologe T-cellen wordt geproduceerd met een productiesysteem van de derde generatie. Daartoe worden een transferplasmide en drie verschillende packagingplasmiden gezamenlijk getransfecteerd in zogenoemde 293T cellen (humane embryonale niercellen). Het transferplasmide levert het genoom voor bovenbeschreven lentivirale vector. Twee packagingplasmiden bevatten de coderende sequentie voor HIV componenten die essentieel zijn voor virusproductie. Dit zijn respectievelijk de eiwitten Gag, Pol en Rev waarbij de coderende sequentie voor Gag en Pol gezamenlijk op één packagingplasmide ligt. Het derde packagingplasmide codeert voor een oppervlakte-eiwit afkomstig van VSV-G. Uit het vectorsysteem zijn de *in-vitro* niet essentiële accessoire en regulatoire HIV-1 genen verwijderd. De productie van de lentivirale vector valt niet onder onderhavige vergunningaanvraag

## 2. Voorgenomen werkzaamheden

Acute lymfatische leukemie (ALL), chronische lymfatische leukemie (CLL) en non-Hodgkin lymfomen (NHL) waaronder diffuus grootcellig B-cel lymfoom (DLBCL) zijn vormen van B cel maligniteiten. De aanvrager wil maximaal 200 patiënten met verschillende B cel maligniteiten in deze studie includeren. Van de patiënt worden in het AMC T-cellen afgenomen en naar de VS verzonden. Hier worden de autologe T-cellen *ex vivo* getransduceerd met de lentivirale vector en vindt voor het genereren van het uiteindelijke medische product, verschillende wasstappen, celexpansie en kwaliteitscontroles plaats voordat CTL019 naar Europa wordt verstuurd.

Na vrijgifte van CTL019 worden in het AMC de getransduceerde cellen, conform de WIP richtlijn genterapie, aan de patiënt toegediend. Afhankelijk van de te behandelen B-cel maligniteit worden de CTL019 getransduceerde T-cellen in één tot drie verschillende infusies intraveneus toegediend. Daarbij krijgen de patiënten  $2 \times 10^6$  tot  $5 \times 10^8$  CTL019 getransduceerde levende T-cellen per infusie. De patiënten worden 1-22 dagen in het ziekenhuis gecontroleerd op mogelijke nadelige effecten van de behandeling. De periode dat de patiënt opgenomen wordt, hangt af van de klinische conditie van de patiënt. Gedurende de studie worden monsters genomen van bloed, urine en beenmergaspiraats, en daarnaast wordt ook een biopsie genomen van de lymfeklieren.

## 3. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in het verleden over twee verschillende klinische studies met retroviraal getransduceerde T-cellen geadviseerd. De eerste klinische studie betrof een behandelmethodes met retroviraal getransduceerde T-cellen tegen huidkanker. Op basis van de gegevens bij de initiële aanvraag kon de COGEM niet verifiëren of de vectorbatch die gebruikt werd om de T-cellen te transduceren vrij was van replicatiecompetent retrovirus (RCR). Tevens kon de COGEM de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes niet geheel uitsluiten. Hiervoor achtte zij enkele aanpassingen in de kweek van de getransduceerde T-cellen noodzakelijk. Derhalve adviseerde zij aanvankelijk niet positief over deze klinische studie.<sup>9</sup> Na aanlevering van aanvullende informatie over de tests op RCR en een aanpassing van de kweekduur concludeerde de COGEM in haar tweede advies over deze aanvraag dat de milieurisico's verwaarloosbaar klein zijn.<sup>10</sup>

De tweede klinische studie betrof een behandelmethodes met retroviraal getransduceerde T-cellen tegen leukemie. Mede op basis van de uitgevoerde RCR-tests achtte de COGEM de kans op de aanwezigheid van RCR in de vectorbatch verwaarloosbaar klein. Daarbij was de reductie van het mogelijk aanwezige aantal vrije vectordeeltjes door de gebruikte kweek- en wasprocedure dusdanig, dat de COGEM de kans op aanwezigheid van infectieuze vrije vectordeeltjes in het preparaat als verwaarloosbaar klein beoordeelde. Aangezien zij in dit geval ook geen noemenswaardige nadelige effecten voorzag van een eventuele verspreiding van de getransduceerde T-cellen in het milieu, achtte zij de milieurisico's van deze studie verwaarloosbaar klein.<sup>11</sup>

## 4. Overweging

In de onderhavige aanvraag worden lentiviraal getransduceerde autologe T-cellen aan patiënten met verschillende soorten B-cel maligniteiten toegediend. Risico's die hierbij kunnen optreden hebben betrekking op (1) de eventuele vorming en de verspreiding van replicatiecompetent lentivirus (RCL) of recombinant virus, (2) de aanwezigheid van vrije virusdeeltjes en (3) de effecten van de mogelijke

verspreiding van de getransduceerde T-cellen in het milieu. Door deze verspreiding zouden andere personen dan de deelnemende patiënten geïnfecteerd kunnen raken met het ggo of met een recombinant virus. Om eventuele milieurisico's die hieruit voortvloeien te kunnen beoordelen is een gedegen karakterisering van het te testen ggo van belang.

#### *4.1. Moleculaire karakterisering*

Voor de modificatie van de in de klinische studie gebruikte T-cellen wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikte SIN lentivirale vector. De vector wordt geproduceerd met een productiesysteem van de derde generatie. De HIV elementen die in de virale vector aanwezig zijn en de expressiecassette voor de CAR die het beoogde klinische effect moet sorteren, worden beschreven in de openbare aanvraag. De aanvrager geeft aan dat het transferplasmide en de drie packagingplasmiden volledig zijn gesequenced en 100% identiek zijn aan de verwachte nucleotidenvolgorde. Tevens heeft de aanvrager eenmaal de nucleotidenvolgorde van de vector gecontroleerd na integratie in het genoom van de T-cellen. De aanvrager meldt dat deze sequentie identiek is aan de sequentie van het gebruikte transferplasmide. De betreffende nucleotidenvolgorde van het transferplasmide en van de vector na integratie in het genoom van de T-cellen zijn niet door de aanvrager overlegd. In de vertrouwelijke informatie wordt wel een gedetailleerde weergave van de gebruikte plasmiden gegeven met, - voor relevante elementen in deze plasmiden -, een verwijzing naar de betreffende sequenties.

De COGEM merkt op dat voor de productie van het medisch product de eigen T-cellen van iedere patiënt worden gebruikt. Hierdoor is het medische product voor iedere patiënt uniek. Aangezien de integratie-sites van de lentivirale vector in het gastheergenoom tot op zekere hoogte willekeurig zijn, zorgt dit ook binnen het medische product voor verschillen tussen de getransduceerde cellen onderling. De COGEM constateert dat de nucleotidenvolgorde van het transferplasmide dat als blauwdruk dient voor het genoom van de virale vector, is bepaald en volledig identiek is aan de verwachte sequentie. Uit de specificaties voor vrijgifte van het medische product CTL019 blijkt dat aanwezigheid en expressie van CAR wordt geverifieerd. De sequentie van het in de T-cellen geïntegreerde virale vector genoom wordt echter niet bepaald. In dit perspectief is het ggo niet exact moleculair gekarakteriseerd. Met het oog op de genoemde verschillen tussen de getransduceerde cellen acht de COGEM een exacte moleculaire karakterisering praktisch gezien ook niet haalbaar.

Op basis van de specifieke lentivirale replicatiecyclus kan de COGEM niet geheel uitsluiten dat er tijdens het productieproces van het medische product enkele puntmutaties in het in de T-cellen geïntegreerde virale vector genoom ontstaan. De aanvrager heeft aangegeven dat bij een controle van de vectorsequentie na integratie in het DNA van T-cellen, de nucleotidenvolgorde identiek was aan de verwachte sequentie. Door het minimale aantal HIV elementen dat in de vector aanwezig is, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat enkele puntmutaties van invloed zijn op de sterke biologische inperking van de gebruikte lentivirale vector. De COGEM is derhalve van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat de beperkte moleculaire karakterisering van de gg-T-cellen tot een misrekening kan leiden in de milieurisicobeoordeling, en acht daarom de uitgevoerde moleculaire karakterisering van het medische product in deze situatie afdoende.

#### 4.2. De kans op de vorming van RCL of recombinant virus

##### Vorming van RCLs tijdens de productie van de virale vector

Een mogelijk risico bij de productie van lentivirale vectordeeltjes is het ontstaan van RCL. In theorie zou RCL kunnen ontstaan door recombinatie tussen de verschillende plasmiden benodigd voor de productie van de virale vector, of de endogene retrovirussequenties die in het genoom van gebruikte cellijn aanwezig zijn.

In onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van een lentiviraal productiesysteem van de derde generatie. Hierin zijn de sequenties die nodig zijn voor productie van de lentivirale vector verdeeld over vier verschillende plasmiden. Tevens zijn de *in-vitro* niet essentiële HIV-1 ORF's: Tat, Vif, Vpr, Vpu, Env en Nef uit het systeem verwijderd. Daarbij zijn de codons in de coderende sequentie voor Gag en Pol geoptimaliseerd en komen niet meer overeen met de wildtype sequentie. De aanvrager merkt op dat de kans op eventuele homologe recombinatie hierdoor nog verder is gereduceerd.

Als onderdeel van de QC procedure wordt de virale vector batch getest op de aanwezigheid van RCL met behulp van een PERT-test. De aanvrager geeft aan dat de detectielimiet van deze op celkweek gebaseerde assay ca. 1 RCL/6x10<sup>7</sup> transducerende eenheden is. Dit betekent dat in de dosis die gebruikt wordt voor productie van CTL019 minimaal 5 RCL deeltjes aangetoond kunnen worden. Tot op heden is in geen van de geproduceerde virale vector batches RCL aangetoond.

Conform haar eerdere generieke advies is de COGEM van mening dat tijdens de productie van lentivirale SIN vectoren met het packagingstelsel van de derde generatie drie recombinatie gebeurtenissen moeten plaatsvinden, de ontbrekende accessoire genen moeten worden opgenomen in het genoom van de vector en de LTR van het SIN-construct gerepareerd dient te worden, alvorens er een replicatiecompetent lentivirus (RCL) zou kunnen ontstaan. Daarbij constateert de COGEM dat de aanwezige sequentiehomologie in de te gebruiken plasmiden minimaal is. In de wetenschappelijke literatuur is nog nooit gerapporteerd dat een derde generatie packagingstelsel in combinatie met een SIN vector tot RCL heeft geleid.

Voordat de virale vector batch wordt gebruikt om de autologe T-cellen te transduceren, wordt deze in een PERT-test gecontroleerd op eventuele aanwezigheid van RCL. Als de batch negatief test op RCL wordt deze goedgekeurd voor gebruik. Op basis van de gevoeligheid van deze test acht de COGEM de kans zeer klein dat eventueel gevormd RCL wordt gemist.

Alle punten in overweging nemende acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de vectorbatch waarmee het medische product wordt gevormd RCL zal bevatten.

##### Recombinatie of complementatie van de vector in het medische product

In theorie zou recombinatie met of complementatie van de virale vector ook kunnen plaatsvinden in de getransduceerde T-cellen met mogelijk het ontstaan van RCL of recombinant virus tot gevolg. Een eerste vereiste hiervoor is de aanwezigheid van een verwant retrovirus in dezelfde cel als de lentiviralevector, die de verloren functies van de vector kan complementeren. De aanvrager geeft aan dat de patiënten worden getest op de aanwezigheid van *Hepatitis B virus*, *Hepatitis C virus*, HIV en *Human T-cell lymphotropic virus*. De detectie van een van deze virussen wordt gehanteerd als exclusie

criterium voor participatie in deze studie. De aanvrager geeft aan dat het medische product met behulp van een kwantitatieve PCR op aanwezigheid van VSV-G DNA als marker voor RCL wordt gecontroleerd.

Door het gehanteerde exclusie-criterium is de COGEM van mening dat de T-cellen die gebruikt worden voor de productie van het medische product geen relevante humane retrovirussen zullen bevatten. Hierdoor kunnen de in de virale vector ontbrekende HIV-1 componenten niet worden aangevuld. Bovendien wijst de COGEM erop dat de in deze studie te gebruiken SIN vector speciaal is ontworpen om de kans op mobilisatie van de vector te minimaliseren. In aanvulling op de PERT test op de virale vector batch geeft de beschreven PCR extra informatie over de vraag of homologe recombinatie tussen de virale vector en één van de packagingplasmiden heeft plaatsgevonden. De COGEM is echter van mening dat de PERT-test meer inzicht biedt in de eventuele aanwezigheid van RCL.

Tot slot merkt de COGEM op dat ca. 8% van het humane genoom uit endogene retrovirale sequenties bestaat. Deze worden voornamelijk gerelateerd aan beta-retrovirussen en in een enkel geval aan gamma-retrovirussen. Door accumulatie van vele inactiverende mutaties coderen deze sequenties geen replicatie competente HERVs.<sup>12,13,14</sup> Daarbij is de COGEM van mening dat het aandeel van HIV sequenties in het genoom van de virale vector tot een minimum is beperkt, wat de kans op homologe recombinatie tussen de endogene retrovirussequenties en de virale vector minimaliseert.

Op grond van bovenstaande acht de COGEM de kans op de aanwezigheid van RCL of recombinant virus door recombinatie of complementatie in de getransduceerde T-cellen verwaarloosbaar klein.

#### *4.3. Aanwezigheid van vrije virusdeeltjes*

Na transductie van de T-cellen kunnen vrije vectordeeltjes afkomstig uit het oorspronkelijke inoculum in het te testen medische product achterblijven. In geval van calamiteiten kan het milieu aan deze vrije vectordeeltjes blootgesteld worden, zoals bij een prikincident waardoor de behandelend arts of het verplegend personeel hiermee besmet kan raken. Door de kweek- en was-procedures die veelal worden gevolgd, voordat het uiteindelijke medisch product wordt verkregen, kan het aantal vrij vectordeeltjes worden gereduceerd. De COGEM heeft een aantal jaar geleden een formule opgesteld om de reductie van de vectordeeltjes als gevolg van de kweek- en wasprocedures te kunnen berekenen.<sup>15</sup> Het betreft de volgende formule:

$$\text{reductieratio} = (20^W \times 200^I * 2^{2,4T}) / C_i$$

In deze formule is W het aantal wasstappen, I het aantal inactiverende wasstappen met trypsine of humaan serum en T de kweektijd in dagen na de transductie. De factor 2,4 is hierbij gebaseerd op de halfwaardetijd van een lentivirusvector bij een temperatuur van 37°C.<sup>16</sup> Tot slot is  $C_i$  het aantal virusdeeltjes in het oorspronkelijke inoculum. Voor open handelingen met getransduceerde zoogdiercellen heeft de COGEM een reductieratio van minimaal 100 geadviseerd, hetgeen inhoudt dat door verdunning en inactivatie maximaal 0,01 virusdeeltje per kweek over gebleven is.



De aanvrager geeft aan dat de T-cellen met maximaal  $2.3 \times 10^{12}$  lentivirale vectordeeltjes wordt getransduceerd. Na de transductie volgt een kweekperiode van minimaal 8 dagen (T) en worden de getransduceerde T-cellen 7 maal gewassen (W) alvorens het uiteindelijke medische product (CTL019) wordt verkregen. Op basis van bovenstaande formule wordt op deze wijze een reductieratio van 339 gerealiseerd.

De COGEM is van mening dat de door haar opgestelde formule om het aantal vrije vectordeeltjes in te schatten op correcte wijze door de aanvrager is toegepast. Daarbij wordt met de verkregen reductieratio ruimschoots voldaan aan de door haar gestelde minimale reductieratio van 100. Bovendien bevat het kweekmedium 5% humaan serum. In humaan serum zit zogenaamd 'complement' dat onderdeel uitmaakt van het humoraal immuunsysteem. Het complement is in staat om lentivirusdeeltjes gecombineerd met VSV-G envelopeiwit te inactiveren.<sup>17</sup> De COGEM onderschrijft daarom de mening van de aanvrager dat de feitelijke reductieratio waarschijnlijk nog hoger zal zijn. De COGEM voegt daaraan toe dat zelfs in het theoretische geval dat er nog vrije vectordeeltjes aanwezig zijn, de infectie-efficiëntie bij een prikincident door hetzelfde complement in het bloed geminimaliseerd zal worden.

Zij acht de kans derhalve verwaarloosbaar klein dat er infectieuze vrije virusdeeltjes in het preparaat aanwezig zullen zijn en derden kunnen infecteren bij prikincident tijdens de toediening van het medische product aan de patiënt.

#### *4.4. Effecten van de mogelijke blootstelling van het milieu aan de getransduceerde T-cellen*

De getransduceerde T-cellen worden intraveneus toegediend. Tijdens de toediening en bij de afname van monsters kan niet uitgesloten worden dat gg-T-cellen bij een incident vrijkomen in het milieu. Door accidentele bloedcontacten zoals een prikincident kan het medische personeel besmet raken met de getransduceerde cellen. De aanvrager geeft aan dat er bij handelingen met het medisch product de WIP richtlijn genterapie gevolgd wordt.

Als een gezond individu door een prikincident aan gemodificeerde T-cellen wordt blootgesteld, is de kans groot dat deze cellen direct worden herkend en geëlimineerd door de afweercellen van de ontvanger. De cellen kunnen alleen overleven wanneer de HLA (Humaan Leukocyten Antigen) moleculen volledig gelijk zijn aan die van de patiënt. De kans dat twee niet verwante individuen volledig HLA-identiek zijn is bijzonder klein, omdat er theoretisch gezien meer dan één miljoen verschillende haplotypen zijn. Bovendien heeft ieder individu twee HLA-haplotypen.

In het onwaarschijnlijke geval dat de HLA moleculen volledig gelijk zijn, kunnen de getransduceerde T-cellen een aantal vergelijkbare neveneffecten laten zien als in de beoogde patiënt. Zoals de aanvrager opmerkt kunnen deze neveneffecten in theorie ook optreden bij een prikincident met immuungecompromiteerde personen.

De neveneffecten die in theorie op zouden kunnen treden, zijn onder andere B-cel depletie, T-cel immortalisatie ten gevolge van insertionele mutagenese en ongecontroleerde T-cel proliferatie. De aanvrager geeft hierbij aan dat B-cel depletie van voorbijgaande aard is en immortalisatie van met gamma-retrovirusvectoren gemodificeerde T-cellen en ongecontroleerde T-cel proliferatie nog nooit

zijn waargenomen.<sup>18</sup> Bovendien wijst de aanvrager erop dat bij een prikincident slechts een beperkt deel van de patiëntdosis geïnjecteerd zal worden. Dit reduceert de kans op eventuele bijwerkingen. Op basis van bovenstaande overweging acht de COGEM de kans dat derden in deze studie met deze nadelige effecten geconfronteerd zullen worden verwaarloosbaar klein.

Tot slot is uit eerder onderzoek gebleken dat getransduceerde T-cellen na toediening enkele maanden aanwezig kunnen blijven in patiënten.<sup>19</sup> Derhalve kunnen bijvoorbeeld door een verwonding van de proefpersoon de getransduceerde T-cellen in theorie via bloed of lymfe in het milieu terecht komen. Aangezien de cellen buiten het lichaam niet kunnen overleven, acht de COGEM de kans op verspreiding in het milieu verwaarloosbaar klein.

Gebaseerd op het bovenstaande is de COGEM van mening dat de risico's van de blootstelling van mens en milieu aan de getransduceerde T-cellen verwaarloosbaar klein zijn.

## 5. Conclusie

De aanvrager is van plan een klinische studie uit te voeren waarin lentiviraal getransduceerde T-cellen worden gebruikt die door de expressie van een chimere antigen receptor B-cellen herkennen.

Risico's die hierbij kunnen optreden hebben betrekking op de eventuele vorming en de verspreiding van RCL of recombinant virus, de aanwezigheid van vrije virusdeeltjes in het preparaat en de effecten van de mogelijke verspreiding van de getransduceerde T-cellen in het milieu.

Op basis van de aangeleverde informatie acht de COGEM de kans op de aanwezigheid van RCL, recombinant virus en vrije vectordeeltjes in het preparaat verwaarloosbaar klein. Tevens acht zij de kans op nadelige effecten bij blootstelling van derden of het milieu aan CTL019 verwaarloosbaar klein.

Op basis van bovenstaande is de COGEM van mening dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen verwaarloosbaar klein zijn.

## 6. Referenties

1. Volk WA *et al.* (1996). B cell Development, Receptors and genes. In: Essentials of Medical Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
2. Stoye JP *et al.* (2012). Family Retroviridae. In Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
3. Freed EO & Martin MA (2013), Human Immunodeficient Viruses: Replication. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
4. Cockrell AS & Kafri T (2007). Gene delivery by lentivirus vectors. Mol. Biotechnol. 36: 184-204
5. Zufferey R *et al.* (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. J. Virol. 72: 9873-9880
6. Miyoshi H *et al.* (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. J. Virol. 72: 8150-8157
7. Nicholson IC *et al.* (1997). Construction and characterisation of a functional CD19 specific single chain Fv fragment for immunotherapy of B lineage leukaemia and lymphoma Mol. Immunol. 34: 1157-1165

8. Imai C. *et al.* (2004). Chimeric receptor with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18: 676-684
9. COGEM (2011). Klinische studie met retroviraal getransduceerde humane T-lymfocyten. COGEM advies CGM/110831-01
10. COGEM (2011). Aanvullende informatie over de klinische studie met retroviraal getransduceerde humane T-lymfocyten. COGEM advies CGM/111012-03
11. COGEM (2011). Klinische studie met retroviraal getransduceerde humane T-lymfocyten in leukemiepatiënten. COGEM advies CGM/110913-01
12. Landers ES *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-892
13. Dewannieux M & Heidmann T (2013). Endogenous retroviruses: acquisition, amplification and taming of genome invaders. *Curr. Opin. Virol.* 3: 646-656
14. Villesen P *et al.* (2004). Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome. *Retrovirology* 1: 32-44
15. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. COGEM advies CGM/090331-03
16. Higashikawa F & Chang L (2001). Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology* 280: 124-131
17. DePolo NJ *et al.* (2000). VDV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol. Ther.* 2: 218-222
18. Scholler J *et al.* (2012). Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Sci. Transl. Med.* 4: 132ra53.
19. Morgan RA *et al.* (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314: 126-129