

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
Mevrouw drs. S. van Veldhoven-van der Meer
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 03 januari 2018
KENMERK CGM/180103-02
ONDERWERP Advies klinische studie met CAR gg-T-cellen tegen hematologische maligniteiten

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 17-002 getiteld: 'Evaluation following the administration of autologous T cells genetically modified with a retroviral vector to express Chimeric Antigen Receptors (CAR) in subject with malignant diseases' van het VU medisch centrum, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de milieurisico's van een klinische studie met genetisch gemodificeerde T-cellen in patiënten met verschillende soorten bloedkanker. De patiënten worden behandeld met lichaamseigen T-cellen die door genetische modificatie een chimere antigen receptor (CAR) tot expressie brengen. Deze genetisch gemodificeerde (gg-)T-cellen worden vervolgens teruggeplaatst in de patiënt om een effectieve afweerreactie tegen de tumoren te bewerkstelligen.

Mogelijke risico's die bij deze klinische studie kunnen optreden, hebben vooral betrekking op de eventuele vorming en verspreiding van replicatiecompetent retrovirus (RCR) en de aanwezigheid van vrije virusdeeltjes in het medisch product.

De aanvrager voert meerdere testen uit om de aanwezigheid van RCR in de virale vector uit te sluiten. De COGEM acht deze testen toereikend en de kans op de aanwezigheid van RCR in de virale vector daardoor verwaarloosbaar klein. Door de kweek- en wasprocedures tijdens de productie van de gg-T-cellen, worden eventueel aanwezige infectieuze virusdeeltjes zodanig verdund, dat de kans op aanwezigheid van infectieuze virusdeeltjes in het medisch product verwaarloosbaar klein is. Indien de gg-T-cellen door een incident in derden terecht komen, acht de COGEM de kans op nadelige effecten verwaarloosbaar klein. De patiënt-specifieke T-cellen worden bij andere mensen direct door het immuunsysteem afgestoten en kunnen buiten het lichaam niet overleven.

Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van mening de risico's voor mens en milieu verbonden aan deze klinische studie met deze gg-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 IenW

Klinische studie met retroviraal getransduceerde T-cellen tegen hematologische maligniteiten

COGEM advies CGM/180103-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag (IM-MV 17-002_000) met de titel 'Evaluation following the administration of autologous T cells genetically modified with a retroviral vector to express Chimeric Antigen Receptors (CAR) in subject with malignant diseases'. Het betreft een klinische studie waarbij genetisch gemodificeerde (gg-)T-cellen aan patiënten met hematologische maligniteiten (multipel myeloom, B-cel en T-cel maligniteiten) worden toegediend. Voor deze klinische studie worden lichaamseigen T-cellen *ex vivo* getransduceerd met een replicatie-deficiënte retrovirale vector. Deze vector bevat sequenties voor een 'chimere antigeen receptor' (CAR) gericht tegen antigenen die aanwezig zijn op het celoppervlak van (maligne) cellen. Er worden drie verschillende varianten gg-T-cellen geproduceerd, namelijk AUTO2, AUTO3 en AUTO4. AUTO2 gg-T-cellen bevatten een CAR gericht tegen 'B-cell Maturation Antigen' (BCMA) en 'Transmembrane Activator and calcium-modulator and Cyclophilin ligand Interactor' (TACI) voor de behandeling van multipel myeloom. AUTO3 gg-T-cellen bevatten een CAR gericht tegen het CD19 en CD22 antigeen aanwezig op B-cellen, en AUTO4 gg-T-cellen bevatten een CAR gericht tegen het T Cell Receptor Beta Constant 1 (TRBC1) aanwezig op T-cellen. De gg-T-cellen worden vervolgens teruggeplaatst in de patiënt om de hematologische maligniteit te behandelen. Het doel van de klinische studie is om de veiligheid en verdraagbaarheid van de gg-T-cellen te bepalen. De werkzaamheden voor deze studie zullen worden uitgevoerd in het VU medisch centrum (VUmc).

1.1. Het adaptieve immuunsysteem

B- en T-cellen (ook wel lymfocyten genoemd) ontwikkelen zich vanuit hematopoëtische stamcellen die aanwezig zijn in het beenmerg.¹ Differentiatie van precursorcellen naar volwassen B-cellen gebeurt in het beenmerg, terwijl de differentiatie naar volwassen T-cellen in de thymus plaatsvindt. Het menselijk lichaam bevat ongeveer 2×10^{12} lymfocyten, welke onderdeel vormen van het adaptieve immuunsysteem.² Tijdens de immunrespons worden B-cellen aangezet tot het produceren van antilichamen. Bij T-cellen vindt een cel-gemedieerde afweerreactie plaats, waarbij T-cellen zelf op diverse manieren direct betrokken zijn.

B-cellen en plasmacellen

In de mens komen verschillende typen B-cellen voor met ieder een unieke B-cel receptor op hun celmembraan.³ 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.⁴

De transmembraaneiwwitten CD19 en CD22 zijn 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. Het eiwit komt echter niet voor op pluripotente bloedstamcellen en op andere weefsels. CD19 expressie verhoogt de celsignalering en proliferatieactiviteit, en is noodzakelijk voor onder andere de functie en overleving van B-cellen.⁵ CD22 is een B-cel co-receptor en komt tot expressie vanaf het pro-B stadium (waar het voornamelijk in het cytoplasma aanwezig is) tot in volwassen B-cellen, waar het als transmembraaneiwit tot expressie komt en het expressieniveau hoger ligt. CD22 komt niet meer tot expressie in plasmacellen.^{5,6} Het eiwit fungeert als een adhesiemolecuul voor andere leukocyten, en als een negatieve regulator van de calciumsignalering om de drempel voor de antigeen/receptor stimulatie te verhogen. CD22 komt ook tot expressie in niet-lymfoid weefsel, zoals de ovaria, eileider en appendix.⁵

T-cellen

T-cellen zijn in staat om een breed onderscheid te maken tussen antigenen afkomst van lichaamseigen eiwitten en niet-lichaamseigen eiwitten. Omdat de T-cel respons afhankelijk is van direct contact met antigeen-presenterende cellen, zijn de antigeen receptoren van T-cellen – in tegenstelling tot B-cellen – alleen aanwezig in membraangebonden vorm.⁷ De T-cel receptor (TCR) is vergelijkbaar met antilichamen van B-cellen. Een TCR bestaat uit een heterodimeer van ofwel een α - en β -keten ($\alpha\beta$ TCR) óf een γ - en δ -keten ($\gamma\delta$ TCR). Verreweg de meeste T-cellen hebben $\alpha\beta$ TCRs. De TCR staat in verbinding met andere membraangebonden eiwitten die het signaal van een geactiveerde TCR binnen de cel doorgeven.⁷

1.2 Retrovirussen

Retrovirussen (*Retroviridae*) zijn RNA virussen die veelvuldig worden toegepast als genoverdrachtsysteem. Een dergelijk systeem zorgt voor een stabiele integratie in het genoom van een geïnfecteerde cel. Er kunnen diverse retrovirale vectoren voor dit doel gebruikt worden, waaronder lentivirale vectoren die afgeleid zijn van het *Human immunodeficiency virus* type 1 (HIV-1) en vectoren gebaseerd op het gammaretrovirus *Murine leukemia virus* (MLV). MLV bevat maar enkele genen die coderen voor eiwitten betrokken bij de productie van nieuwe virusdeeltjes, namelijk *gag*, *pro*, *pol* en *env*. Het *gag* gen codeert voor verscheidene structurele eiwitten, terwijl het *pro* gen codeert voor het eiwit protease. Het *pol* gen codeert voor de eiwitten reverse transcriptase (die het virale RNA omzet naar DNA bij infectie van een gastheercel) en integrase (die het DNA in het chromosomale DNA van de gastheercel inbrengt). Het *env* gen codeert voor een oppervlakte- en transmembraaneiwit, dat ervoor zorgt dat het virale membraan fuseert met het membraan van de gastheercel waardoor het virus de cel kan infecteren.^{8,9}

1.3 De productie van de retrovirale vector

In deze vergunningaanvraag wordt een hybride retrovirale vector beschreven die gebaseerd is op het Moloney Murine leukemia virus (MoMLV; een stam van de soort MLV). De aanvrager is voornemens om met behulp van drie verschillende *de novo* gesynthetiseerde vectoren afgeleid van MoMLV een replicatie-deficiënte gepseudotyperde vector te produceren die humane T-cellen kan infecteren. Door

middel van transductie met de replicatie-deficiënte gepseudotypeerde vector worden gg-T-cellen (AUTO2, AUTO3 en AUTO4) gegenereerd die verschillende CARs tot expressie brengen.

MoMLV

MoMLV is een ecotroop muizenvirus dat leukemie kan veroorzaken bij muizen. Het virus is echter alleen pathogeen wanneer de infectie optreedt in pasgeboren muizen en er sprake is van meerdere integraties en persisterende viremie.¹⁰ Tot op heden is er geen bewijs gevonden dat MoMLVs en andere gammaretrovirussen infecties in mensen kunnen veroorzaken, en ook zijn er geen causale verbanden tussen blootstelling aan MoMLV virussen en ziekte bij mensen aangetoond.^{10,11} Het virus infecteert alleen delende cellen, is niet-lytisch en integreert in het genoom van een geïnfecteerde cel waar het aanwezig blijft als een DNA provirus. De extracellulaire halfwaardetijd van MoMLV wordt geschat op 6 à 8 uur.¹²

Helperplasmiden en pAUTO2, pAUTO3 en pAUTO4

De replicatie-deficiënte virale vector wordt geproduceerd door transiënte transfectie van HEK293T/17 cellen met drie verschillende plasmiden. Het eerste (helper)plasmide (MP27000) bevat de genetische informatie voor de structurele virale eiwitten (*gag* en *pol* genen) en is volledig gesequenced. Het tweede (helper)plasmide (MP27001) bevat het *env* gen dat codeert voor het RD114 eiwit afkomstig van een endogeen feline type C retrovirus¹³, dat opgenomen wordt in de envelop van de replicatie-deficiënte vectorpartikels. Door aanwezigheid van dit eiwit kunnen de gegenereerde replicatie-deficiënte vectorpartikels humane T-cellen infecteren. Ook MP27001 is volledig gesequenced. Van het derde plasmide bestaan drie varianten die elk een CAR transgen bevatten die specifiek is voor elk product (pAUTO2, pAUTO3 of pAUTO4). Deze genoomplasmiden bevatten onder andere de 5' en 3'LTRs en het 'extended packaging' signaal (i.e., de 'packaging' sequentie, 'splice donor' en 'splice acceptor site', en de 'primer binding site') van wildtype MoMLV, waarin zich ook het 5' deel van het *gag* gen bevindt. Omdat het startcodon in het 5' deel van het *gag* gen gemuteerd is (ATG→GTG), komt het Gag eiwit niet tot expressie in deze plasmiden. De eiwitproducten van de CAR transgenen zijn afkomstig van een enkele ORF en worden co-translationeel gesplitst door het 2A peptide.¹⁴ De sequentie die codeert voor het 2A peptide is afkomstig van het *Thosea asigna virus* (TaV). De DNA sequenties van de CARs en de *gag*, *pol* en RD114 *env* genen zijn codon-geoptimaliseerd en de plasmiden zijn *de novo* gesynthetiseerd.

Het pAUTO2 plasmide bevat een APRIL-CAR construct dat gebruik maakt van het receptorbindingsdomein van humaan 'A Proliferation Inducing Ligand' (APRIL) gericht tegen 'B-cell maturation antigen' (BCMA) en 'transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor' (TACI). Daarnaast komt RQR8 tot co-expressie, dat functioneert als een 'safety switch' wanneer toxiciteit optreedt als bijwerking van de therapie. RQR8 bevat een rituximab-bindend domein waardoor gg-T-cellen waarin RQR8 tot expressie komt selectief uitgeschakeld kunnen worden door toediening van het monoklonale antilichaam rituximab.¹⁵ De RQR8 sequentie en de CAR sequentie zijn gescheiden door een 2A sequentie afkomstig van TaV. Het pAUTO3 plasmide bevat een CD19/CD22 CAR construct waarbij gebruik is gemaakt van anti-CD19 en anti-CD22 antilichamen afkomstig van muizen, waarin humane endo- en transmembrane domeinen zijn

geconstrueerd. De CD19 en CD22 sequenties zijn gescheiden door de 2A sequentie afkomstig van TaV. Het pAUTO4 plasmide bevat een 'anti-T cell Receptor Beta Chain 1' (aTRBC1) afkomstig van muizen, waarin humane endo- en transmembrane domeinen zijn geconstrueerd. Ook komt de 'safety-switch' RQR8 tot co-expressie in pAUTO4 en zijn de RQR8 sequentie en de CAR sequentie gescheiden door de 2A sequentie van TaV.

Na co-transfectie van HEK293T/17 cellen met MP27000, MP27001 en pAUTO2, pAUTO3 of pAUTO4 wordt een RD114 gepseudotyperde retrovirale vector geproduceerd waarmee de T-cellen worden getransduceerd.

2. Voorgenomen werkzaamheden

Bij iedere te behandelen patiënt worden T-cellen geïsoleerd. De productie van de retrovirale vector en de transductie van de T-cellen zal plaatsvinden in Engeland. De gg-T-cellen (AUTO2, AUTO3 AUTO4) worden vervolgens weer getransporteerd naar Nederland en intraveneus toegediend aan maximaal 120 patiënten met plasma neoplasieën (40 patiënten), B-cel hematologische maligniteiten (60 patiënten) of T-cel lymfoom (20 patiënten). De gg-T-cellen bevinden zich in een infuuszak en wordt gekoppeld aan een intraveneuze lijn. De patiënten zullen behandeld worden met een startdosering van $1,5 \times 10^7$ - $3,5 \times 10^7$ gg-T-cellen voor volwassenen, en $1,0 \times 10^6$ gg-T-cellen per kilogram lichaamsgewicht voor de pediatrische patiënten. Als er voldaan wordt aan de veiligheidsparameters kan de dosering in daaropvolgende patiënten verhoogd worden. De maximale dosering bedraagt $4,5 \times 10^8$ gg-T-cellen en kan als enkele dosering toegediend worden, of gesplitst worden en na een week herhaald worden. Wanneer er toxische bijwerkingen ontstaan, kan bij behandeling met AUTO2 en AUTO4 rituximab toegediend worden om de gg-T-cellen te vernietigen. De patiënten worden 7 tot 30 dagen gehospitaliseerd. Van de patiënten zullen bloed, hersenvocht, beenmerg-, bot- en tumorbipten worden afgenomen. Wanneer de patiënten ontslagen worden uit het ziekenhuis, worden zij door de onderzoekers gevraagd om geen bloed te doneren, hun huisarts te informeren over deelname aan de studie en een 'emergency safety card' bij zich te dragen. Patiënten met een actieve bacteriële (syfilis) of virale ziekte (door infectie met HIV, HTLV of de hepatitisvirussen HBV en HCV) zijn uitgesloten van deelname. Ook worden er geen deelnemers geïnccludeerd die zwanger zijn of borstvoeding geven.

3. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft verscheidene keren geadviseerd over klinische studies met retroviraal getransduceerde humane T-cellen. De retrovirale vectoren die gebruikt zijn in deze studies zijn gebaseerd op MoMLV. In 2011 is geadviseerd over een behandelmethodes met gg-T-cellen tegen huidkanker.¹⁶ De COGEM kon aanvankelijk niet positief adviseren over deze studie aangezien de aangeleverde gegevens ontoereikend bleken. Zij kon niet verifiëren of de vectorbatch vrij was van replicatiecompetent retrovirus (RCR) en tevens niet uitsluiten dat er vrije vectordeeltjes aanwezig waren in het preparaat dat aan de patiënt zou worden toegediend. Nadat de aanvrager hier aanvullende informatie over had aangeleverd was de COGEM in haar tweede advies van oordeel dat de milieurisico's van deze studie verwaarloosbaar klein zijn.¹⁷

Daarnaast heeft de COGEM geadviseerd over klinische studies met retroviraal getransduceerde T-cellen waarbij gg-T-cellen werden ingezet als behandelmethodes tegen leukemie¹⁸, B-cel

maligniteiten^{19,20}, en hematologische of solide tumoren²¹. Zij achtte de milieurisico's verbonden aan deze klinische studies verwaarloosbaar klein, hoewel zij in een enkel geval om een uitgebreidere moleculaire karakterisering heeft gevraagd.¹⁹

Ook heeft de COGEM in 2016 positief geadviseerd over een klinische studie waarbij lentiviraal getransduceerde T-cellen (met behulp van een vector gebaseerd op *Human immunodeficiency virus type 1*) ingezet werden als behandelmethode voor B-cel maligniteiten.²²

4. Overweging en advies

In de onderhavige aanvraag worden gg-T-cellen (AUTO2, AUTO3 of AUTO4) toegediend aan patiënten met hematologische maligniteiten. Mogelijke risico's die hierbij kunnen optreden, hebben betrekking op (1) de eventuele vorming van RCR of recombinant virus, (2) de aanwezigheid van vrije virusdeeltjes en (3) de effecten van mogelijke verspreiding van de gg-T-cellen in het milieu. Door deze verspreiding zouden andere personen dan de deelnemende patiënten geïnfecteerd kunnen raken met de gg-T-cellen of met een recombinant virus. Om eventuele milieurisico's die hieruit voortvloeien te kunnen beoordelen, is een gedegen karakterisering van de gg-T-cellen van belang.

4.1 Moleculaire karakterisering

De COGEM heeft in 2013 criteria voor de moleculaire karakterisering van ggo's voor medische toepassingen vastgesteld. Hierin staat vermeld dat het insert in het ggo volledig gesequenced dient te worden. De sequentieanalyse dient het insert met eventueel gebruikte recombinatiesequenties te omvatten en dient aan weerszijden van het insert enkele tientallen nucleotiden door te lopen in het genoom van het acceptororganisme.²³

Voor de productie van het medisch product worden van iedere patiënt de lichaamseigen T-cellen. Hierdoor is het medische product voor iedere patiënt uniek. De aanvrager stelt dat, conform het COGEM advies uit 2013²³, sequentieanalyses van het eindproduct (AUTO2, AUTO3, en AUTO4) geen relevante informatie opleveren voor de milieurisicobeoordeling. Aangezien de integratie-sites van de retrovirale vector in het gastheergenoom tot op zekere hoogte willekeurig zijn, zorgt dit binnen het medische product voor verschillen tussen de getransduceerde cellen onderling. Ook 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 vectorgenoom ontstaan. Met het oog op de genoemde verschillen tussen de getransduceerde cellen acht de COGEM een exacte moleculaire karakterisering praktisch gezien dan ook niet relevant en haalbaar. De COGEM is 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.

De aanvrager stelt dat alle plasmiden twee keer volledig zijn gesequenced, één keer tijdens het celbankstadium en een tweede keer bij de kwaliteitscontrole van het eindproduct. De resultaten zijn vergeleken met de sequentiegegevens die gebruikt zijn om de plasmiden te synthetiseren en kwamen overeen met de sequenties van het NCBI. De COGEM is van oordeel dat de aanvrager de moleculaire karakterisering afdoende heeft uitgevoerd.

4.2 Kans op vorming van RCR of recombinant virus

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

Vorming van RCR tijdens de productie van de virale vector

In deze aanvraag wordt gebruik gemaakt van een retrovirale vector waaruit de genen die essentieel zijn voor de levenscyclus van het virusdeeltje, *gag*, *pro*, *pol* en *env*, zijn verwijderd. De genoomplasmiden bevatten nog wel het 5' deel van het *gag* gen, maar door een mutatie in het startcodon komt het Gag eiwit in deze plasmiden niet tot expressie. De vector is hierdoor niet meer in staat om te repliceren. De genen voor de virale eiwitten zijn verspreid over verschillende helperplasmiden die in de cellijn getransfecteerd worden, waardoor er meerdere recombinities nodig zijn om een replicatiecompetente vector te verkrijgen en de kans op het ontstaan van RCR wordt verminderd.²⁴

Hoewel voor de reconstructie van het gehele genoom meerdere recombinitie 'events' nodig zijn om een infectieus virusdeeltje te construeren, is de COGEM van oordeel dat theoretisch gezien de kans op het ontstaan van RCR bij de productie van de virale vector niet uit te sluiten is. Daarom is een RCR test ter bevestiging van de theoretische risicoanalyse noodzakelijk. De aanvrager geeft aan dat de Master Cell Bank (MCB) getest is op aanwezigheid van RCR door middel van een 'quantitative Fluorescent Product Enhanced Reverse Transcriptase' (qFPERT) assay (met een detectielimiet van 10^3 MoMLV units) die de activiteit van het 'reverse transcriptase' (RT) eiwit detecteert. Er zijn 7 monsters van de MCB getest en in geen van alle monsters is RT activiteit waargenomen. De aanvrager stelt dat elke vectorbatch, zowel het virale supernatant als de 'end of production cells' (EPCs) gecontroleerd zullen worden op aanwezigheid van RCR met behulp van een 'PG4 S+/L- endpoint co-culture assay' (met een detectielimiet van 10 'focus forming units' (ffu) per geïnoculeerd sample). De aanvrager stelt dat tot op heden nog geen RCR is aangetoond in andere studies waar retrovirale vectoren zijn toegepast.²⁴ De COGEM acht de testen gevoelig genoeg om RCR te detecteren en oordeelt dat de kans verwaarloosbaar klein is dat met deze uitgevoerde testen RCR wordt gemist.

Recombinatie of complementatie van de vector in het medische product

In theorie zou recombinitie met of complementatie van de virale vector ook kunnen plaatsvinden in de getransduceerde T-cellen met mogelijk het ontstaan van RCR of recombinant virus tot gevolg, indien een verwant retrovirus in dezelfde cel de verloren functies van de vector kan complementeren. De aanvrager geeft aan dat de RCR test niet wordt uitgevoerd op het eindproduct (de gg-T-cellen), omdat het virale supernatant dat gebruikt wordt voor de transductie van de T-cellen al getest wordt op RCR. De aanvrager stelt dat de vectorsequentie weinig overlap heeft met de sequentie van humane endogene retrovirussen. Potentieel zouden patiënten met HTLV of HIV geïnfecteerd kunnen raken, maar een BLAST analyse toont aan dat er geen significante overeenkomsten zijn tussen het HTLV en HIV genoom en de vectorsequentie. Ook geeft de aanvrager aan dat de patiënten worden getest op de aanwezigheid van humane retrovirussen HTLV, HIV, en de hepatitisvirussen HBV en HCV. Indien patiënten met één van deze virussen geïnfecteerd zijn, worden ze uitgesloten van deelname aan de

studie. Door het gehanteerde exclusie criterium is de COGEM van mening dat de T-cellen die gebruikt worden voor de productie van het medisch product geen relevante humane retrovirussen zullen bevatten. Hierdoor is de kans op complementatie of recombinatie van de in de virale vector ontbrekende componenten verwaarloosbaar klein. Ook bij een mogelijke retrovirale infectie van de patiënt na toediening van de gg-T-cellen acht de COGEM de kans op een milieurisico verwaarloosbaar klein, omdat een muizengammaretrovirus vanwege beperkte sequentiehomologie slecht gecomplementeerd kan worden door humane lentivirussen of endogene retrovirussen. In het uitzonderlijke geval dat er complementatie van de retrovirale vector plaatsvindt, zal dit alsnog een verwaarloosbaar klein milieurisico geven, aangezien de virale vector replicatiedeficiënt is en zich niet verder kan verspreiden.

Op grond van bovenstaande acht de COGEM de kans op de aanwezigheid van RCR of recombinant virus door recombinatie of complementatie in de getransduceerde T-cellen verwaarloosbaar klein. De COGEM acht het daarom niet noodzakelijk om een RCR test uit te voeren op het medische product.

4.3 Aanwezigheid van vrije virusdeeltjes

Na transductie van de T-cellen kunnen vrije vectordeeltjes in het te testen medisch product achterblijven. In geval van calamiteiten zouden deze vrije vectordeeltjes naar derden kunnen verspreiden, zoals bij een prikincident waardoor de behandelend arts of het verplegend personeel hiermee besmet kan raken. Door de kweek- en wasprocedures die worden gevolgd, voordat het uiteindelijke medisch product wordt verkregen, kan het aantal vrije 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.²⁵ De aanvrager heeft deze formule toegepast en geeft aan dat bij een maximale dosering van 1×10^8 virusdeeltjes een virus reductieratio van 182,5 gerealiseerd wordt (dat overeenkomt met gemiddeld 0,005 virusdeeltjes per toe te dienen batch AUTO2, AUTO3 of AUTO4). Hierbij is rekening gehouden met een halfwaardetijd van de virusvector bij een temperatuur van 37°C van 10 uur, en 7 dagen kweektijd. De aanvrager geeft echter aan ook een kweektijd van 5 dagen aan te houden en stelt dat de halfwaardetijd van een retrovirale vector met RD114 envelop op basis van literatuurgegevens 4 tot 8 uur bedraagt.^{26,27} Bij 5 dagen kweektijd bedraagt de reductieratio 6,6 en uitgaande van een halfwaardetijd van 8 uur en 5 dagen kweektijd, zal de reductieratio 52,4 bedragen, die in beide gevallen onder het door de COGEM gestelde minimum is. De aanvrager meldt dat de transductie plaatsvindt in zakken die gecoat zijn met RetroNectin, waardoor de efficiëntie van de transductie toeneemt en er minder vrije virusdeeltjes overblijven. In twee onafhankelijke experimenten heeft de aanvrager aangetoond dat er gemiddeld 6,2% van de vectordeeltjes aanwezig is in het supernatant na transductie. De aanvrager stelt dat het gebruik van RetroNectin beschouwd kan worden als inactiveringsstap en geeft aan dat uitgaande van 10% overgebleven virale vector na transductie de virale reductieratio 524,3 zal bedragen ($(20^4 \times 2^{3 \times 5}) / (10^8 \times 10\%)$).

De COGEM is van oordeel dat er bij een kweektijd van 7 dagen voldaan wordt aan door haar gestelde minimale virus reductieratio van 100. Indien de aanvrager voornemens is een kweektijd van 5 dagen aan te houden, is de behaalde virus reductieratio volgens de gangbare berekeningswijze te laag. De COGEM is echter van oordeel dat de aanvrager voldoende heeft aangetoond dat er een additionele reductie plaatsvindt door het gebruik van RetroNectin zakken en acht derhalve de kans verwaarloosbaar klein dat er infectieuze vrije virusdeeltjes in de AUTO2, AUTO3 of AUTO4 producten aanwezig zullen zijn en derden kunnen infecteren via bijvoorbeeld een prikincident tijdens de toediening van het medisch product aan de patiënt.

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

Aanvrager geeft aan dat gg-T-cellen voor een langere periode (bijvoorbeeld 20 jaar) in lage hoeveelheden aanwezig kunnen zijn in de patiënt. Uit studies blijkt dat getransduceerde T-cellen enkele maanden na toediening nog aanwezig kunnen zijn in patiënten.²⁸ In verschillende studies zijn gg-T-cellen langer dan 6 maanden na de behandeling aangetoond in patiënten^{29,30}, en in een enkele studie zijn een jaar na infusie gg-T-cellen gedetecteerd in twee van de 17 patiënten.²⁸ Derhalve kunnen bijvoorbeeld door een verwonding van de proefpersoon de getransduceerde T-cellen in theorie via bloed of lymfe in het milieu terecht komen. De gg-T-cellen worden niet uitgescheiden via speeksel, urine of feces. Aangezien de cellen buiten het lichaam niet kunnen overleven, acht de COGEM de kans op verspreiding in het milieu verwaarloosbaar klein.

Door incidenten, zoals een prikincident, kan het medische personeel besmet raken met de getransduceerde cellen. Als een gezond individu door een prikaccident 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 MHC-moleculen volledig gelijk zijn aan die van de patiënt. De kans dat twee niet-verwante individuen volledig MHC-identiek zijn, is bijzonder klein, omdat er theoretisch gezien meer dan één miljoen verschillende haplotypen zijn. Bovendien heeft ieder individu twee MHC-haplotypen. In het onwaarschijnlijke geval dat de MHC-moleculen identiek zijn, kunnen de getransduceerde T-cellen een vergelijkbaar anti-tumor effect laten zien als in de beoogde patiënt.

Er is een theoretische mogelijkheid dat bij bijvoorbeeld een prikincident met een immunogecompromitteerd persoon geen eliminatie van de gg-T-cellen plaatsvindt. In dit geval zullen de effecten gelijk zijn aan die van de beoogde patiënt. Bij een prikincident zullen echter beduidend minder gg-T-cellen geïnjecteerd worden dan bij een normale toediening bij een patiënt.

Overdracht van T-cellen van moeder op kind

Het is niet uitgesloten dat gg-T-cellen via borstvoeding of placenta kunnen worden overgedragen van moeder op kind. Het is bij de COGEM niet bekend hoe lang dergelijke T-cellen in het kind kunnen persisteren. De COGEM zal, na nader onderzoek, terugkomen op de levensduur van gg-T-cellen, de mogelijke overdracht van gg-T-cellen van moeder op kind, en eventuele risico's van gg-T-cellen voor het kind. Vooralnog zijn er echter geen aanwijzingen dat er risico's verbonden zijn aan de overdracht

van gg-T-cellen van moeder op kind. De aanvrager is voornemens om zwangere patiënten en patiënten die borstvoeding geven uit te sluiten van deelname, wat eventuele risico's verder reduceert.

5. Conclusie

De aanvrager is van plan een klinische studie uit te voeren waarin retroviraal getransduceerde T-cellen worden gebruikt die verschillende CARs tot expressie brengen. Risico's die hierbij kunnen optreden, hebben betrekking op de eventuele vorming en de verspreiding van RCR of recombinant virus, de aanwezigheid van vrije virusdeeltjes in het toe te dienen product, 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 moleculaire karakterisering afdoende en de kans op de aanwezigheid van RCR, recombinant virus en vrije vectordeeltjes in het toe te dienen product verwaarloosbaar klein. Tevens acht zij de kans op nadelige effecten bij blootstelling van derden aan gg-T-cellen verwaarloosbaar klein.

Met inachtneming van de gehanteerde exclusiecriteria van de aanvrager, is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met retrovirale-vector getransduceerde T-cellen verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Alberts B *et al.* (2002). Chapter 22: Histology: the lives and deaths of cells in tissues. Renewal by multipotent stem cells: blood cell formation. In: *Molecular biology of the cell*, 4th edition. Ed. Gibbs S, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York
2. Alberts B *et al.* (2002). Chapter 24: The adaptive immune system. Lymphocytes and the cellular basis of adaptive immunity. In: *Molecular biology of the cell*, 4th edition. Ed. Gibbs S, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York
3. Volk WA *et al.* (1996). B cell Development, Receptors and genes. In: *Essentials of Medical Microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
4. Nutt SL *et al.* (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15: 160-171
5. Sikaria S *et al.* (2016). Monoclonal antibodies and immune therapies for adult precursor B-acute lymphoblastic leukemia. *Immunol. Lett.* 172:113-123
6. Tedder TF *et al.* (1997). CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 481-504
7. Alberts B *et al.* (2002). Chapter 24: The adaptive immune system cells and MHC proteins. In: *Molecular biology of the cell*, 4th edition. Ed. Gibbs S, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York
8. 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
9. Rein A (2011). Murine Leukemia Viruses: objects and organisms. *Adv. Virol.* 2011: 1-14

10. Molony murine leukemia virus safety data sheet.
<https://healthsciences.ucsd.edu/som/pediatrics/research/labs/miyanohara-lab/safety/Pages/moloney-murine.aspx> (bezocht: 04-12-2017)
11. Brooks J *et al.* (2012). No evidence of cross-species transmission of mouse retroviruses to animal workers exposed to mice. *Transfusion* 52: 317-325
12. Ghani K *et al.* (2009). Efficient human hematopoietic cell transduction using RD114- and GALV-pseudotyped retroviral vectors produced in suspension and serum-free media. *Hum. Gene Ther.* 20: 966-974
13. McAllister RM *et al.* (1972). C-type virus released from cultured human rhabdomyosarcoma cells. *Nat. New Biol.* 235: 3-6
14. Luke GA *et al.* (2008). Occurrence, function and evolutionary origins of '2A-like' sequences in virus genomes. *J Gen Virol.* 89: 1036-1042
15. Philip B *et al.* (2014). A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy. *Blood* 124: 1277-1287
16. COGEM (2011). Klinische studie met retroviraal getransduceerde humane T-lymfocyten. COGEM advies CGM/110831-01
17. COGEM (2011). Aanvullende informatie over de klinische studie met retroviraal getransduceerde humane T-lymfocyten. COGEM advies CGM/111012-03
18. COGEM (2011). Klinische studie met retroviraal getransduceerde T-cellen tegen leukemie. COGEM advies CGM/110913-01
19. COGEM (2016). Klinische studie met getransduceerde T-cellen tegen B-cel maligniteiten. COGEM advies CGM/161130-01
20. COGEM (2017). Aanvullende informatie klinische studie met KTE-C19. COGEM advies CGM/170224-04
21. COGEM (2017). Klinische studie met TEG001 ter behandeling van hematologische en solide tumoren. COGEM advies CGM/171013-02
22. COGEM (2016). Klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen tegen B-cel maligniteiten. COGEM advies CGM/160229-01
23. COGEM (2013). Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing. COGEM advies CGM/130227-05
24. Bear AS *et al.* (2012). Replication-competent retroviruses in gene-modified T cells used in clinical trials: is it time to revise the testing requirements? *Mol. Ther.* 20: 246-249
25. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. COGEM advies CGM/090331-03
26. Kelly PF *et al.* (2001). RD114-Pseudotyped Oncoretroviral Vectors. Biological and Physical Properties. *Ann. N Y Acad. Sci.* 938: 262-276
27. Ghani K *et al.* (2009). Efficient human hematopoietic cell transduction using RD114- and GALV-pseudotyped retroviral vectors produced in suspension and serum-free media. *Hum. Gene Ther.* 20: 966-974

28. Morgan RA *et al.* (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314: 126-129
29. Porter DL *et al.* (2011). Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 365: 725-733
30. Kalos M *et al.* (2011). T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. *Sci Transl Med.* 3: 95ra73