

Aan de minister van  
Infrastructuur en Waterstaat  
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 29 oktober 2020  
**KENMERK** CGM/201029-01  
**ONDERWERP** Advies klinische studie met allogene *ex vivo* recombinant AAV-vector  
getransduceerde T-cellen (CTX130)

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 20-013\_000 getiteld 'A Phase 1, Open-Label, Multicenter, Dose Escalation and Cohort Expansion Study of the Safety and Efficacy of Allogeneic CRISPR-Cas9–Engineered T Cells (CTX130) in Adult Subjects with Malignancies' van het Nederlands Kanker Instituut, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de milieurisico-aspecten van een klinische studie waarbij volwassen patiënten met niercelcarcinoom (RCC) of met T- of B-cel maligniteiten, behandeld worden met een genetherapeutisch middel genaamd CTX130.

De COGEM heeft in 2019 in een advies een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met adeno-associated virus (AAV)-vectoren opgesteld en geoordeeld dat de risico's voor mens en milieu bij klinische studies met deze vectoren verwaarloosbaar klein zijn, mits aan een aantal randvoorwaarden wordt voldaan. Anders dan eerdere klinische studies met AAV-vectoren waarover de COGEM in het verleden heeft geadviseerd, wordt bij de onderhavige studie de recombinante AAV (rAAV)-vector niet direct aan de patiënt toegediend. In plaats daarvan wordt de rAAV-vector in combinatie met CRISPR-Cas9, gebruikt om allogene (lichaamsvreemde) T-cellen *ex vivo* (buiten het lichaam) genetisch te modificeren. Vervolgens worden de genetisch gemodificeerde (gg-)T-cellen (het medisch product CTX130) aan de patiënt toegediend. In deze gg-T-cellen zijn drie genen in het genoom geïnactiveerd en wordt een chimere antigen receptor (CAR) gericht tegen CD70 (dat met name aanwezig is op humane tumorcellen) tot expressie gebracht.

De COGEM is van oordeel dat de onderhavige klinische studie onder de reikwijdte van de generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met AAV-vectoren valt en voldoet aan de criteria van deze milieurisicobeoordeling. Alles in oegenschouw nemende is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij voorgenomen klinische studie met CTX130 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.
- Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
  - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's  
DG Milieu en Internationaal
  - Dr. B. te Riet, Loket Gentherapie
  - Dr. K.R.J. Vanmolkot, Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek
  - Mr. N. Gušić, Ministerie van VWS

# **Klinische studie met allogene *ex vivo* recombinant AAV-vector getransduceerde T-cellen (CTX130)**

## **COGEM advies CGM/201029-01**

### **1. Inleiding**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag van het Nederlands Kanker Instituut (IM-MV 20-013). Het betreft een klinische studie getiteld ‘A Phase 1, Open-Label, Multicenter, Dose Escalation and Cohort Expansion Study of the Safety and Efficacy of Allogeneic CRISPR-Cas9–Engineered T Cells (CTX130) in Adult Subjects with Malignancies’. De klinische fase I studie heeft als doel de veiligheid en werkzaamheid van een gentherapeutisch middel ter behandeling van patiënten met niercelcarcinoom (RCC), of met T- of B-cel maligniteiten te onderzoeken.

De COGEM heeft in 2019 in een advies een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met adeno-associated virus (AAV)-vectoren opgesteld en geoordeeld dat de risico's voor mens en milieu bij klinische studies met deze vectoren verwaarloosbaar klein zijn, mits aan een aantal randvoorwaarden wordt voldaan (zie §2).<sup>10</sup> Anders dan eerdere klinische studies met AAV-vectoren waarover de COGEM in het verleden heeft geadviseerd, wordt bij de onderhavige studie de recombinante AAV (rAAV)-vector niet direct aan de patiënt toegediend. In plaats daarvan wordt de rAAV-vector in combinatie met CRISPR-Cas9 gebruikt om allogene T-cellen *ex vivo* genetisch te modificeren. Vervolgens worden de allogene genetisch gemodificeerde (gg-)T-cellen (het medisch product CTX130) aan de patiënt toegediend. In deze gg-T-cellen zijn drie genen in het genoom geïnactiveerd onder meer om de herkenning van CTX130 als lichaamsvreemd te verkleinen, en wordt een chimere antigen receptor (CAR) gericht tegen CD70 (dat met name aanwezig is op humane tumorcellen) tot expressie gebracht.

### **2. Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft de afgelopen jaren een groot aantal adviezen uitgebracht over klinische studies waarbij gebruik werd gemaakt van virale vectoren die afgeleid zijn van AAV. Het betrof studies ter behandeling van stofwisselingsziekten,<sup>1,2,3</sup> hartfalen,<sup>4</sup> hemofilie,<sup>5,6,7</sup> reuma,<sup>8</sup> en spinale musculaire atrofie.<sup>9</sup> De voorgelegde dossiers en gebruikte vectoren vertonen veel overlap, en bij alle studies bleken de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Mede naar aanleiding hiervan, heeft de COGEM in 2019 een advies uitgebracht over een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met AAV-vectoren met als doel de vergunningverleningsprocedure voor dit type studies te vereenvoudigen.<sup>10</sup> In dit advies concludeerde de COGEM dat:

- AAV-vectoren geattenuerd en biologisch ingeperkt zijn, en vanwege hun replicatie-deficiënte eigenschap niet in het milieu kunnen verspreiden. Dit is ongeacht het AAV species of serotype waarvan de vector is afgeleid.

- Incidentele waargenomen schadelijke effecten na toediening van AAV-vectoren hebben betrekking op de patiënt zelf. Deze effecten leiden niet tot een verhoogd milieurisico.
- AAV-vectoren kunnen na toediening uitgescheiden worden, maar vanwege hun biologische inperking is verdere verspreiding niet mogelijk.
- De kans dat AAV-vectoren via de kiembaan worden overgedragen is verwaarloosbaar klein.
- Indien een AAV-vector recombineert met wild-type AAV, of wild-type AAV een AAV-vector complementeert, zijn de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Vanwege het replicatie-deficiënte karakter van deze vectoren en het feit dat alleen de 'inverted terminal repeats' (ITR's) van AAV nog maar aanwezig zijn, heeft de COGEM geoordeeld dat de risico's voor mens en milieu bij klinische studies met AAV-vectoren verwaarloosbaar klein zijn, mits aan een aantal randvoorwaarden wordt voldaan.<sup>10</sup> Zij adviseert bij deze studies de volgende randvoorwaarden in acht te nemen:

- De ITR's en capsid-eiwitten zijn afkomstig van AAV's, dat wil zeggen virussen behorende tot het genus *Dependoparvovirus* die voor *in vivo* replicatie afhankelijk zijn van een helpervirus (zoals *Adeno-associated dependo-parvovirus A*, *Adeno-associated dependoparvovirus B*, *Avian dependoparvovirus 1*, *Chiropteran dependoparvovirus 1*, *Pinniped dependoparvovirus 1* en *Squamate dependoparvovirus 1*);
- Indien ten behoeve van de vectorproductie gebruik is gemaakt van een helpervirus, dient dit te zijn geïnactiveerd of verwijderd;
- De gehele nucleotidensequentie van de AAV-vector is vastgesteld en dient ter verificatie te zijn vergeleken met de nucleotidensequentie van de beoogde vector.<sup>a</sup>

Het onderhavige medisch product (CTX130) bestaat uit allogene gg-T-cellen. De T-cellen worden *ex vivo* genetisch gemodificeerd met CRISPR-Cas9 en met een rAAV-vector die de anti-CD70 CAR coderende sequentie bevat. Dit wordt hieronder nader toegelicht.

### 3. CRISPR/Cas9 'gene-editing'

Allereerst worden de T-cellen gemodificeerd met behulp van CRISPR-Cas9. Hiertoe worden de T-cellen geëlectroporeerd met CRISPR/Cas9 ribonucleoproteïne (RNP)-complexen. Elk CRISPR/Cas9 RNP-complex bestaat uit een Cas9 eiwit, en een 'single guide RNA' (sgRNA) dat gericht is tegen een bepaald locus. In het vertrouwelijk deel van de vergunningaanvraag worden de toegepaste CRISPR/Cas9 RNP-complexen nader gespecificeerd. De T-cellen worden geëlectroporeerd met de CRISPR/Cas9 RNP

---

<sup>a</sup> In de vergadering van de COGEM subcommissie Medisch Veterinair van 30 januari 2020 heeft de COGEM geconcludeerd dat de moleculaire karakterisering van klinische studies met AAV vectoren voldoende is als onder meer als onderdeel van de vergunningaanvraag vectorkaartjes en beschrijvingen van de productieplasmides zijn overlegd, en er is aangegeven dat deze plasmiden gesequenced zijn en dat de AAV sequenties in de plasmiden identiek zijn aan de beoogde sequentie.

complexen, waarna de cellen getransduceerd worden met de rAAV vector die de anti-CD70 CAR coderende sequentie bevat (zie §4) .

#### **4. Samenstelling en productie van de rAAV vector**

Uit de replicatie-deficiënte rAAV vector die gebruikt wordt voor de transductie van de T-cellen zijn enkel de ITR's van AAV-2 aanwezig; alle andere sequenties waaronder de coderende sequenties voor replicatie- en capsid-eiwitten zijn verwijderd.

Het vectorgenoom van de rAAV vector bevat de anti-CD70 CAR expressiecassette die onder controle staat van een 'elongation factor 1 alpha' (EF-1 $\alpha$ ) promotor en synthetische poly(A) signaalsequentie. De exacte samenstelling van het CAR transgen wordt in het vertrouwelijk deel van de vergunningaanvraag nader gespecificeerd.

De anti-CD70 CAR expressiecassette wordt geflankeerd door sequenties die homologo zijn aan sequenties van 'TCR  $\alpha$  chain locus'. Deze zogenaamde linker en rechter 'homology arms' (TRAC LHA en TRAC RHA) worden op hun beurt geflankeerd door de ITR's van AAV-2.

Om de rAAV vector te produceren wordt gebruik gemaakt van drie plasmiden. Eén plasmide bevat de anti-CD70 CAR expressiecassette omgeven door de twee 'homology arms' die geflankeerd zijn met de linker en rechter ITR's. Het AAV packaging plasmide levert *in trans* de AAV-2 Rep en AAV-6 Cap eiwitten aan die benodigd zijn voor de replicatie en 'packaging' van de rAAV vectorgenomen in vectordeeltjes. Voor de productie van de rAAV vector wordt een helperplasmide gebruikt die de benodigde 'helpergenen' van het adenovirus aanlevert. Het pAD-Helper plasmide codeert voor de adenovirale helpervirus eiwitten E2A en E4, en het 'viral associated' (VA) RNA die benodigd zijn voor replicatie van het AAV vectorgenoom in HEK293 cellen. De rAAV vector wordt geproduceerd door de genoemde plasmiden te co-transfecteren in HEK293 cellen. De productie van de replicatie-deficiënte rAAV vector vindt in het buitenland plaats en maakt geen deel uit van de onderhavige vergunningaanvraag.

#### **5. Bereiding van het medisch product CTX130 (gg-CAR-T-cellen)**

Voor de productie van de allogene gg-T-cellen worden T-cellen afkomstig van gezonde donoren, geïsoleerd uit 'peripheral blood mononuclear cells' (PBMC's) die met leukafereze zijn verkregen. Er vindt een verrijkingstap voor T-cellen plaats, waarna deze geactiveerd worden met 'anti-CD3/CD28 antibody-coated beads'. Vervolgens worden de T-cellen geëlectroporeerd met de CRISPR-Cas9-RNP complexen waarna de cellen getransduceerd worden met de rAAV vector die de anti-CD70 CAR expressiecassette bevat. De cellen worden vermeerderd en er vinden zuiveringsstappen plaats waarna de T-cellen worden gecryopreserveerd. De productie van de gg-T-cellen (CTX130) maakt geen deel uit van de voorliggende vergunningaanvraag.

In het medisch product, de gg-T-cellen (CTX130), zijn de TRAC, B2M en CD70 genen geïnactiveerd. Verder is een anti-CD70 CAR transgen in het TRAC locus geïnsereerd. De inactivaties van TRAC en CD70 verkleinen respectievelijk de kans op 'graft-versus host disease' en de kans op afstoting van CTX130. De inactivatie van het CD70 gen verhoogt volgens de aanvrager de activiteit en 'health' van

CTX130. De anti-CD70 CAR zorgt ervoor dat de gg-T-cellen tumorcellen die CD70 tot expressie brengen, aanvallen.

## **6. Klinische studie in het kort**

De patiënten krijgen een enkele dosis van CTX130 toegediend via intraveneuze infusie. De aanvrager geeft aan dat voorafgaand aan de studie verschillende lymfodepletie agentia zullen worden toegediend aan de patiënt om te voorkomen dat de gg-T-donorcellen als lichaamsvreemd worden herkend en direct worden afgestoten. De maximale toegediende dosis is  $1 \times 10^9$  CAR-T-cellen. Tijdens alle handelingen met het ggo (restitutie, toediening, etc.) worden standaardhygiënemaatregelen in acht genomen. Al het afval wordt vernietigd volgens biohazard afvoerprocedures die gelden voor het ziekenhuis.

## **7. Overwegingen**

In 2019 heeft de COGEM een advies uitgebracht over een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met AAV-vectoren.<sup>10</sup> Klinische studies met AAV-vectoren die voldoen aan de in het advies opgestelde randvoorwaarden, hoeven niet meer aan de COGEM voor advies te worden voorgelegd.

Anders dan eerdere klinische studies met AAV-vectoren waarover de COGEM in het verleden heeft geadviseerd, wordt bij de onderhavige studie de rAAV vector niet direct aan de patiënt toegediend. In plaats daarvan wordt de rAAV vector in combinatie met CRISPR-Cas9 gebruikt om T-cellen *ex vivo* genetisch te modificeren, waarna de gg-T-cellen (het medisch product CTX130) aan de patiënt worden toegediend.

De COGEM is van oordeel dat de onderhavige klinische studie onder de reikwijdte van de generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met AAV-vectoren valt. Hieronder licht de COGEM toe of de onderhavige studie aan de criteria van de generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met AAV-vectoren voldoet.

### **7.1 ITR en capsid-eiwitten**

In het generieke COGEM advies voor klinische toepassingen met AAV-vectoren heeft de COGEM gesteld dat de ITR-s en capsid-eiwitten afkomstig moeten zijn van AAV's. In de onderhavige studie zijn de ITR's afkomstig van AAV-2 en capsid-eiwitten van AAV-6. Hiermee voldoet de nu ter beoordeling voorliggende klinische studie aan dit criterium van het generieke advies.

### **7.2 Aanwezigheid van helpervirus in vector batches**

In het generieke COGEM advies, heeft de COGEM gesteld als er tijdens de vectorproductie gebruik is gemaakt van helpervirus, dit vervolgens geïnactiveerd of verwijderd moet worden. Voor de productie van de rAAV vector wordt in plaats van een helpervirus, een helperplasmide gebruikt die de benodigde 'helpergenen' van het adenovirus *in trans* aanlevert. Dit criterium is daarom niet relevant voor de nu ter beoordeling voorliggende klinische studie.

### **7.3. Moleculaire karakterisering**

De COGEM heeft recent geconcludeerd dat de moleculaire karakterisering van klinische studies met AAV vectoren voldoende is als vectorkaartjes en beschrijvingen van de productieplasmiden zijn

overlegd, en er is aangegeven dat deze plasmiden gesequenced zijn en dat de AAV sequenties in de plasmiden identiek zijn aan de beoogde sequentie.<sup>a</sup>

De aanvrager heeft de sequenties van de sgRNA's die worden toegepast voor de 'gene-editing' van de T-cellen, alsook de plasmidekaartjes van de productieplasmiden en van de rAAV vector met beschrijvingen, in het vertrouwelijk deel van de aanvraag overlegd. De aanvrager geeft aan dat als acceptatiecriterium voor vrijgifte van de drie productieplasmiden en de rAAV vector met sequentie-analyse dient te zijn vastgesteld dat de sequenties identiek zijn aan de referentiesequenties.

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

### **8. Conclusie en advies**

In 2019 heeft de COGEM een advies uitgebracht over een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met AAV-vectoren.<sup>10</sup> Klinische studies met AAV-vectoren die voldoen aan de in het advies opgestelde randvoorwaarden, hoeven niet meer aan de COGEM voor advies te worden voorgelegd. De COGEM is van oordeel dat de onderhavige klinische studie onder de reikwijdte van de generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met AAV-vectoren valt en voldoet aan de criteria van deze milieurisicobeoordeling. Alles in ogenschouw nemende is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij voorgenomen klinische studie met CTX130 verwaarloosbaar klein zijn.

### **9. Signalerende opmerking**

CTX130 bestaat uit allogene gg-T-cellen afkomstig van gezonde donoren. Vanwege de aangebrachte modificaties worden de gg-T-cellen bij een eventuele overdracht naar derden, in de ontvanger mogelijk niet als lichaamsvreemd herkend en niet door het immuunsysteem vernietigd. Bij directe overdracht van de gg-cellen bij donatie van lichaamsmateriaal (bloed, stamcellen, weefsels en organen), zwangerschap, het geven van borstvoeding of het doneren van moedermelk bestaat hierdoor een potentieel risico voor derden. Eventuele mensgebonden risico's van donatie van lichaamsmateriaal, zwangerschap, het geven van borstvoeding en moedermelkdonatie worden niet meer onder de vergunningverlening van gg-organismen beoordeeld en geadresseerd.<sup>11,12</sup> Daarnaast zouden de gg-T-cellen bij de toediening van het medisch product als gevolg van een prikaccident kunnen worden overgedragen naar medisch personeel. De COGEM signaleert 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 de patiënten hebben ondergaan, zodat zij dit in hun overwegingen mee kunnen nemen.

### **10. Algemene opmerking**

De COGEM merkt op dat een groot deel van technische gegevens met betrekking tot het medisch product CTX130 als vertrouwelijk zijn aangemerkt door de aanvrager. Om deze reden wordt in het onderhavige COGEM advies enkel in globale zin ingaan op de totstandkoming van het medisch product.

## Referenties

1. COGEM (2005). Gentherapie van lipoproteïne lipase (LPL) deficiënte patiënten met een adeno-associated virale vector coderend voor het LPL-eiwit (AMT-010). COGEM advies CGM/050530-01
2. COGEM (2018). Klinische studie met genetisch gemodificeerd Adeno-associated virus ter behandeling van patiënten met glycogeenstapelingsziekte type Ia (GSDIa). COGEM advies CGM/181231-02
3. COGEM (2017). Klinische studie met gg-AAV in patiënten met het Crigler-Najjar syndroom. COGEM advies CGM/170821-01
4. COGEM (2013). Een fase 2b klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met hartfalen. COGEM advies CGM/130603-01
5. COGEM (2015). Een fase I/II klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met een ernstige tot matig ernstige hemofilie B. COGEM advies CGM/150617-01
6. COGEM (2018). Klinische studie met een gg-AAV-FIX variant ter behandeling van patiënten met matige of ernstige hemofilie B. COGEM advies CGM/180625-01
7. COGEM (2018). Klinische studie met genetisch gemodificeerd Adeno-associated virus ter behandeling van patiënten met ernstige hemofilie A. COGEM advies CGM/181231-03
8. COGEM (2016). Klinische studie met genetisch gemodificeerd Adeno-associated virus ter behandeling van patiënten met reumatoïde artritis (LUMC). COGEM advies CGM/160719-02
9. COGEM (2019). Klinische studie met genetisch gemodificeerd Adeno-associated virus ter behandeling van patiënten met spinale musculaire atrofie. COGEM advies CGM/190429-01
10. COGEM (2019). Generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met AAV-vectoren. COGEM advies CGM/190905-01
11. COGEM (2020). Beoordeling van risico's voor derden bij gentherapiestudies met replicatiedeficiënte ggo's en gg-T-cellen. COGEM advies CGM/200123-01
12. Minister van Infrastructuur en Waterstaat (2020). Beleidsnota Biotechnologie 27428, nr. 366. <https://zoek.officielebekendmakingen.nl/kst-27428-366.html> (bezoekt: 14 oktober 2020)