

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

DATUM 10 december 2020
KENMERK CGM/201210-01
ONDERWERP Advies klinische studie met iPSC-afgeleide producten


Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 20-016_000 getiteld 'Application of iPSC-derived clinical products to replace or restore the function of cells, tissues and/or organs affected by disease, ageing or trauma' van het Leiden Universitair Medisch Centrum (LUMC), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

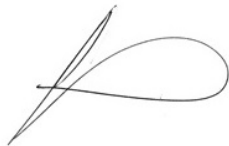
De COGEM is gevraagd te adviseren over een brede vergunningaanvraag voor een klinische studie naar de toepassing van geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSCs). Hiervoor worden menselijke lichaamscellen buiten het lichaam geherprogrammeerd met behulp van plasmiden, waardoor deze cellen veranderen in stamcellen. Deze stamcellen worden vervolgens gestimuleerd om te differentiëren en daarbij het gewenste cel- of weefseltype te ontwikkelen. Deze klinische studie betreft de behandeling van patiënten met het gedifferentieerde celproduct om functieverlies van weefsel/organen door ziekte, ouderdom of trauma te herstellen.

De iPSCs worden tijdens de kwaliteitscontrole gecontroleerd op afwezigheid van plasmidesequenties of integratie van sequenties afkomstig van de plasmide. De COGEM is van oordeel dat met de voorgenomen combinatie van testen afdoende aangetoond kan worden dat er geen plasmide meer aanwezig is en geen integratie van plasmidesequenties is opgetreden in de iPSCs. Het is niet volledig uit te sluiten dat derden (voornamelijk medisch personeel) blootgesteld kunnen worden aan iPSC-afgeleide celproducten, bijvoorbeeld bij snij- en prikincidenten. Echter, in deze gevallen zal het afweersysteem van de ontvanger deze cellen vernietigen. Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's van de toepassing van iPSC-afgeleide celproducten in de voorgenomen klinische studie verwaarloosbaar klein zijn.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

- c.c.
- Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
DG Milieu en Internationaal
 - Dr. D. Horst, Loket Genterapie
 - Dr. K.R.J. Vanmolkot, Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek
 - Drs. K.E. Kok, Ministerie van VWS

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM lid prof. dr. R.C. Hoeben niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Klinische studie naar de toepassing van celproducten afgeleid van geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC)

COGEM advies CGM/201210-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een brede vergunningaanvraag van het Leiden Universitair Medisch Centrum (LUMC, IM-MV 20-016) voor een klinische studie naar de toepassing van geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSCs). Voor deze klinische studie worden humane somatische cellen door transiënte transfectie met episomale plasmides geherprogrammeerd naar pluripotente stamcellen. De productie en opslag van de iPSCs, en de differentiatie van de iPSCs naar het gewenste celtype valt onder een vergunning voor Ingeperkt Gebruik (IG 15-104_Ik). Deze klinische studie betreft de behandeling van patiënten met het gedifferentieerde celproduct om functieverlies van weefsel of organen door ziekte, ouderdom of trauma te herstellen.

2. Productie van iPSCs (IG toepassing)

De iPSCs worden ontwikkeld door somatische cellen te isoleren uit patiënten (of donoren voor allogeen gebruik), en deze te herprogrammeren door middel van *ex vivo* transfectie met episomale plasmiden die humane reprogrammeerfactor-sequenties (L-MYC, LIN28, SOX2, KLF4, OCT3/4, GLIS1, Nanog, p53 sh), zogenaamde Yamakana factoren, bevatten. Door transiënte expressie van deze reprogrammeerfactoren wordt het genexpressieprofiel in de somatische cellen aangepast en verandert de cel van een gedifferentieerde naar een pluripotente staat.¹ Er worden verschillende plasmiden gebruikt om de cellen te herprogrammeren naar iPSCs. De gebruikte reprogrammeerfactoren, promotoren en andere elementen om genexpressie te optimaliseren variëren tussen de plasmiden. Alle plasmiden bevatten de 'origin of replication' van het Epstein-Barr virus (EBV), het 'Epstein-Barr nuclear antigen 1' (EBNA), dat volgens de aanvrager zorgt voor episomale amplificatie van de plasmide. Daarnaast is in alle plasmiden een antibioticaresistentiegen (*beta-lactamase* (ampicilline), *aadA14* (spectinomycine/ streptomycine), *cat* (chloramphenicol), *nptII* (kanamycine), *tnI4* (tetracycline) of *ble* (bleomycine)) aanwezig.

De identiteit van de plasmiden wordt bevestigd door het sequensen van PCR-fragmenten met primers die specifiek zijn voor de reprogrammeerfactoren en flankerende sequenties. De aanvrager stelt dat de sequenties minstens 99% identiek dienen te zijn aan de originele plasmiden.

Voorafgaand aan het verkrijgen van de somatische cellen worden de donoren getest op *Human immunodeficiency virus 1 en 2* (HIV-1/2), *Human T-lymphotropic virus 1 en 2* (HTLV-1/2), EBV en cytomegalovirus (CMV), en dienen zij negatief getest te zijn, alvorens de cellen gebruikt kunnen worden. Door transfectie met de episomale plasmiden zullen de somatische cellen converteren naar iPSC. De verkregen iPSCs zijn afkomstig van een enkele cel en worden klonaal vermeerderd. In verloop van de tijd verliezen zij de plasmiden. Als 'release criterium' van de iPSC cellen geldt dat deze cellen vrij moeten zijn van episomale plasmiden, en dat uitgesloten dient te worden dat er integratie van plasmide DNA in het gastheergenoem heeft plaatsgevonden. Tijdens de 'Quality Control (QC) testing' wordt met PCR getest op aanwezigheid van residuele episomale plasmiden (criteria voor afwijzing: >1

plasmide kopie per 1000 cellen), en als deze negatief is, wordt vervolgens met behulp van ‘Whole Genome Sequencing’ (WGS, met 50x ‘genome coverage’) gecontroleerd of er geen integratie van het plasmide in het genoom heeft plaatsgevonden. Ook worden de iPSCs gecontroleerd op afwezigheid van EBV en CMV, bepaald met qPCR (detectielimiet: 10 virale DNA kopieën per 0,1 µg DNA (=1 virale kopie per 1000 cellen)).

3. Differentiatie van iPSCs naar het gewenste celtype (medisch product, IG toepassing)

De goedgekeurde iPSC cellen worden vermeerderd om een ‘Master Cel Bank’ (MCB) te vormen. Vanuit de MCB kunnen *in vitro* verschillende celtypen geproduceerd worden, door aan het kweekmedium specifieke groeifactoren toe te voegen. Er worden geen kiemcellen geproduceerd.

4. Voorgenomen klinische studie

De gedifferentieerde cellen worden in de klinische studie toegediend aan de patiënt, door injectie, infusie of transplantatie, afhankelijk van het celtype. Aan deze klinische studie zullen 50.000 patiënten deelnemen. De aanvrager stelt dat de gedifferentieerde cellen niet (goed) onderscheiden kunnen worden van andere humane cellen, omdat er geen transgeen DNA aanwezig is. De aanvrager heeft als onderdeel van de vergunningaanvraag een milieurisicoanalyse uitgevoerd. Hierin wordt onder meer gesteld dat de gebruikte plasmiden niet aanwezig zijn in het eindproduct en geen modificaties in de sequentie van het gastheergenoom plaats hebben gevonden (getest met behulp van PCR en WGS), het risico van onbedoelde blootstelling aan gedifferentieerde iPSCs (bijvoorbeeld bij een prikincident) eerder is aan blootstelling aan reguliere humane cellen en dat deze cellen door het immuunsysteem van de ontvanger vernietigd zullen worden. Verspreiding van de gedifferentieerde cellen buiten het lichaam wordt niet mogelijk geacht, en door afwezigheid van transgeen DNA is de aanvrager van mening dat er ook geen overdracht van transgeen DNA kan plaatsvinden naar andere organismen. De aanvrager acht het risico van deze iPSC-afgeleide gedifferentieerde cellen voor de gezondheid gelijk aan het gebruik van andere normale humane cellen. Er worden standaard hygiënemaatregelen gevolgd bij toediening van het celproduct, en bij eventuele incidenten wordt de standaardprocedure gevolgd voor incidenten met humaan materiaal.

5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft nog niet eerder advies uitgebracht over klinische studies met producten afgeleid van iPSCs. Wel heeft zij verscheidene adviezen uitgebracht over klinische studies met genetisch gemodificeerde (gg-)cellen, waarbij het transgene DNA geïntegreerd is in het genoom van de gastheercel door transductie met voornamelijk lenti- of retrovirale vectoren.^{e.g.,2,3,4} Ook heeft de COGEM in het verleden geadviseerd over een vereenvoudigde procedure voor gentherapiestudies met ‘naakt DNA’,⁵ i.e., DNA dat niet omhuld is door een eiwitmantel en niet codeert voor virale sequenties, en dat direct in het lichaam wordt geïnjecteerd. Hierin heeft de COGEM geconcludeerd dat, indien het naakte DNA voldoet aan de gestelde criteria en bij het opvolgen van de gestelde voorschriften, de milieurisico's bij klinische studies waarbij met naakt DNA verwaarloosbaar klein zijn.

6. Overwegingen en advies

In de onderhavige aanvraag voor een klinische studie worden iPSC-afgeleide cellen toegediend aan patiënten om functieverlies van weefsel/organen door ziekte, ouderdom of trauma te herstellen. Onderzoek naar iPSCs is relatief nieuw; de iPSCs zijn ontwikkeld in 2006. De eerste klinische studie met een iPSC-afgeleid product vond plaats in 2014 en betrof de behandeling van een patiënt met iPSC-afgeleide retina pigment epitheel (RPE) cellen ter behandeling van macula degeneratie.^{1,6,7} De eerste generatie iPSCs werd ontwikkeld met behulp van retrovirale vectoren, maar vanwege de kans op negatieve effecten ten gevolge van insertionele mutagenese zijn integratie-vrije methoden ontwikkeld, waaronder het gebruik van adenovirusvectoren, plasmiden, sendaivirusvectoren en synthetische mRNAs. Voor de ontwikkeling van iPSCs die toegepast worden in een klinische setting worden tegenwoordig veelal episomale plasmiden gebruikt.^{1,8}

Ook in de onderhavige aanvraag voor de klinische studie worden iPSCs gebruikt die door middel van episomale plasmiden zijn geherprogrammeerd. Transfectie met episomale plasmiden is van tijdelijke aard; de iPSCs worden tijdens de 'quality control' gecontroleerd op afwezigheid van plasmidesequenties en op integratie van sequenties afkomstig van de plasmide. De COGEM merkt op dat niet valt uit te sluiten dat er met zeer lage frequenties homologe recombinatie of integratie op kan treden tussen plasmidesequenties en gastheergenoem, met name wanneer de genen die in de plasmide aanwezig zijn ook in het gastheergenoem voorkomen. Dit kan echter gedetecteerd worden met WGS, wanneer door uitwisseling van genen verschillen in sequentie ontstaan. De COGEM merkt op dat de gevolgen van eventuele recombinatie een eventueel patiënt-risico betreft en geen milieurisico, omdat de iPSC-afgeleide cellen zich buiten het lichaam niet kunnen verspreiden, en omdat er in de onderhavige klinische studie geen kiemcellen zullen worden geproduceerd. De COGEM is van oordeel dat met de combinatie van PCR en WGS afdoende aangetoond kan worden dat er geen plasmide meer aanwezig is in de iPSCs en geen integratie van plasmidesequenties heeft opgetreden.

Het is niet volledig uit te sluiten dat derden (voornamelijk medisch personeel) blootgesteld kunnen worden aan iPSC-afgeleide celproducten, bijvoorbeeld bij snij- en prikincidenten. Echter, in deze gevallen zal het afweersysteem van de ontvanger deze cellen vernietigen.

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's van de toepassing van iPSC-afgeleide celproducten in de voorgenomen klinische studie verwaarloosbaar klein zijn.

7. Signalerende opmerking

De iPSC-afgeleide cellen die toegepast worden in deze klinische studie zijn in eerste instantie vervaardigd door middel van transfectie met een episomaal plasmide. Deze plasmide verdwijnt na verloop van tijd uit de gastheercel. In het eindproduct (de iPSC-afgeleide cellen) is geen plasmide meer aanwezig en zijn geen sequentiewijzigingen geïnduceerd. De COGEM signaleert dat er mogelijk discussie kan ontstaan of het terecht is dat deze klinische toepassing onder het kader van de ggo-regelgeving, en daarmee onder de ggo-vergunningsplicht valt.

Referenties

1. Takahashi K & Yamanaka S (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17: 183-193
2. COGEM (2020). Gentherapiestudie met retroviraal getransduceerde T-cellen ter behandeling van CLDN6-positieve maligniteiten. COGEM advies CGM/200616-01
3. COGEM (2019). Klinische studie met lentiviraal getransduceerde CD34+ cellen ter behandeling van cerebrale adrenoleukodystrofie (CALD). COGEM advies CGM/191114-01
4. COGEM (2019). Generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met *ex vivo* retro- en lentiviraal getransduceerde cellen. COGEM advies CGM/190729-01
5. COGEM (2012). Vereenvoudiging procedure voor verlening vergunningen van klinische studies met naakt DNA. COGEM advies CGM/120927-01
6. Trounson A & DeWitt ND (2016). Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nature Reviews, Mol. Cel. Biol.* 17: 194-200
7. Watanabe MM *et al.* (2017). Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N. Eng. J. Med.* 376: 1038-1046
8. Doss MX & Sachinidis A (2019). Current challenges of iPSC-based disease modeling and therapeutic implications. *Cells* 8: 403