

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

DATUM 17 juni 2021
KENMERK CGM/210617-01
ONDERWERP Advies klinische studie met iPSC-afgeleide mesenchymale stromale cellen (MSCs)

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 21-003_000 getiteld 'Application of Mesenchymal Stromal Cells (MSC) derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC) to restore the function of cells, tissues and/or organs affected by immune dysregulation' van het Leiden Universitair Medisch Centrum (LUMC), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

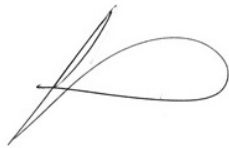
De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een klinische studie naar de behandeling van patiënten met zogenaamde 'mesenchymale stromale cellen' (iMSCs). Dit zijn cellen die zich in het lichaam ontwikkelen tot cellen die deel uitmaken van ondersteunende weefsels, zoals kraakbeen, botten en vetweefsel. De iMSCs worden verkregen uit zogenaamde geïnduceerde stamcellen (iPSCs). De iPSCs worden gemaakt door cellen uit het lichaam van de patiënt (of een donor) te isoleren en ze dan te behandelen met specifieke plasmiden, waardoor deze cellen veranderen in stamcellen. Na verloop van tijd verdwijnen de gebruikte plasmiden uit deze stamcellen. iPSCs kunnen zich ontwikkelen tot verschillende typen cellen, maar zullen in onderhavig geval ontwikkelen als iMSCs. In deze klinische studie zullen patiënten behandeld worden met de iMSCs om functieverlies van cellen, weefsels of organen door verstoringen van het immuunsysteem, te herstellen.

De iPSCs en iMSCs worden tijdens de kwaliteitscontrole gecontroleerd op afwezigheid van de ingebrachte plasmidesequenties met behulp van een PCR-assay. Met deze controle kan echter niet uitgesloten worden dat er met zeer lage frequentie integratie van plasmidesequenties in het genoom van de cel heeft plaatsgevonden. De COGEM merkt op dat de gevolgen van eventuele integratie ten hoogste een potentieel risico vormt voor de patiënt. De iMSCs zijn vergelijkbaar met andere lichaamscellen, bevatten geen schadelijke genproducten en kunnen zich buiten het lichaam niet handhaven of verder verspreiden. Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's van de toepassing van iPSC-afgeleide iMSCs 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. ir. M.M.C. Gielkens, Loket Genterapie
 - Dr. B. te Riet, 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 behandeling met mesenchymale stromale cellen (iMSC) afgeleid van geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC)

COGEM advies CGM/210617-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag van het Leiden Universitair Medisch Centrum (LUMC, IM-MV 21-003) voor een klinische studie naar de behandeling van patiënten met mesenchymale stromale (ofwel stam)cellen (MSCs) afgeleid van geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSCs). Deze iPSC-afgeleide MSCs (iMSCs) worden ingezet om functieverstel te verkrijgen van weefsels of organen, die aangetast zijn door immuundysregulatie.

De productie en opslag van de iMSCs valt onder een vergunning voor Ingeperkt Gebruik (IG 15-104_1k). Deze vergunningaanvraag voor een klinische studie betreft het toedienen van iMSCs aan patiënten, het verwerken van monsters verkregen gedurende de studie en de afvalverwerking. De aanvraag is grotendeels identiek aan een eerdere aanvraag van het LUMC voor klinische studies met iPSC-afgeleide celproducten (IM-MV 20-016) waarover de COGEM in 2020 heeft geadviseerd.¹ De onderhavige vergunningaanvraag verschilt van de eerdere aanvraag in de toegepaste kwaliteitscontrole van de iPSCs en daarvan afgeleide iMSCs.

1.1 Achtergrondinformatie toepassing (i)MSCs

MSCs zijn multipotente cellen die aangetroffen worden in het beenmerg. Van MSCs is bekend dat zij immunosuppressieve en -regulatorische eigenschappen bezitten die geïnduceerd worden door cytokines die bij ontsteking van beschadigd weefsel geproduceerd worden. Na toediening aan de patiënt migreren deze cellen naar beschadigd weefsel en spelen ze een rol bij weefselherstel. Waarschijnlijk gebeurt dit door differentiatie naar cellen die het beschadigd weefsel kunnen vervangen, en het moduleren van de ontstekingsreactie.² De toepassing van autologe of allogene MSCs als behandeling blijkt in de praktijk lastig te zijn vanwege de cellulaire heterogeniteit en veroudering van cellen bij *ex vivo* vermeerdering waardoor deze het vermogen tot replicatie verliezen ('replicative senescence').³ Om deze obstakels te omzeilen zijn iPSC-afgeleide MSCs (iMSCs) ontwikkeld. In een eerste preklinische studie met een muismodel voor 'Graft versus Host Disease' (GvHD) waarbij vanuit het donormateriaal een immuunrespons optreedt tegen de weefsels van de ontvanger, bleken iMSCs de ziekteprogressie te verminderen en een positief effect te hebben op overleving door immunomodulerende eigenschappen.⁴ In een eerste fase I klinische studie naar de veiligheid van iMSCs in patiënten met steroïde-resistente (SR-)GvHD, werd de behandeling met iMSCs in het algemeen goed getolereerd en zijn geen serieuze ernstige bijwerkingen gerapporteerd die te wijten waren aan de behandeling.³

2. Productie van iMSCs (IG toepassing)

De iMSCs die in onderhavige studie zullen worden toegepast zijn afgeleid van iPSCs. Deze iPSCs worden verkregen door *ex vivo* transfectie van allogene humane somatische cellen met episomale plasmiden die humane herprogrammeerfactoren, zogenaamde Yamakana factoren, bevatten. Door transiënte expressie van de herprogrammeerfactoren wordt het genexpressieprofiel in de somatische

cellen aangepast en verandert de cel van een gedifferentieerde naar een pluripotente staat.⁵ De transfectie met episomale plasmiden is van tijdelijke aard; na enkele passages van de geherprogrammeerde cellen raken de episomale plasmiden verloren. De donor van de somatische cellen wordt vooraf getest op onder andere *Human immunodeficiency virus 1* en I (HIV-1/2), human T-lymphotropic virus 1 en 2 (HTLV-1/2), en cytomegalovirus (CMV), en dient negatief getest te zijn alvorens de cellen gebruikt kunnen worden.

Er worden verschillende plasmiden gebruikt om de cellen te herprogrammeren naar iPSCs. De plasmiden variëren in de verschillende onderdelen, zoals de promotoren, de gebruikte herprogrammeerfactor-sequenties (L-MYC, LIN28, SOX2, KLF4, OCT3/4, GLIS1, Nanog, p53 sh) en andere elementen om genexpressie te optimaliseren. Deze elementen zijn onder andere virale sequenties zoals het ‘Woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element’ (WPRE) van het *Woodchuck hepatitis virus*, de ‘immediate early enhancer’ van het humane cytomegalovirus en het polyadenyleringssignaal van simian virus 40. 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 bevatten alle plasmiden een antibiotica-resistentiegen (*beta-lactamase* (ampicilline), *aadA14* (spectinomycine/ streptomycine), *cat* (chloramphenicol), *nptII* (kanamycine), *tnI4* (tetracycline) of *ble* (bleomycine)).

De identiteit van de plasmiden wordt bevestigd door dubbelstrengs-sequentieanalyse van de gehele plasmide. Er wordt minimaal een viervoudige dekkingsgraad (per DNA-streng een tweevoudige dekking) bereikt, met een hogere dekking (viervoudige voor een enkele DNA-streng) in regio’s met sterke secundaire structuren, repetitieve sequenties of een hoog ‘GC’ aandeel.

De iMSCs worden verkregen vanuit de iPSCs met behulp van een productieproces onder serum-vrije omstandigheden zoals beschreven in Bloor *et al.* 2020.³ Hierbij worden groeifactoren en andere eiwitten aan het kweekmedium toegevoegd om celdifferentiatie te bewerkstelligen. In een eerste differentiatieronde wordt de ontwikkeling van iPSCs naar mesodermcellen geïnduceerd. Hieruit worden kolonievormende mesodermcellen gevormd, ook wel mesenchymangioblasten (MCA) genoemd. Tijdens de kweek van MCA gaan eventueel aanwezige ongedifferentieerde iPSCs verloren. In een volgende stap differentiëren de MCA in de uiteindelijke iMSCs.

Van de iPSCs wordt de stabiliteit bepaald met behulp van ‘comparative genomic hybridization’ (CGH) en ‘single-nucleotide polymorphism’ (SNP) analyses. Hierbij worden de iPSC monsters voor en na vermeerdering na 10 passages met elkaar vergeleken. Ook wordt gecontroleerd op (mogelijk) klinisch relevante mutaties door de resultaten te vergelijken met een ‘agilent reference genome’.

Tevens worden zowel de iPSCs als de iMSCs als onderdeel van de kwaliteitscontrole gecontroleerd op afwezigheid van plasmide DNA met behulp van PCR (criteria voor afwijzing: >1 plasmidekopie per 1000 cellen). Hiermee kan aanwezigheid of integratie van het plasmidegenoom gedetecteerd worden, maar zeldzame integratie van kleinere plasmidesequenties in het gastheergenoom kan hiermee niet aangetoond worden. Bij de PCR-assay worden twee primersets gebruikt die gericht zijn op de EBV

‘origin of replication’ en EBNA1 regio, waarmee volgens de aanvrager uitgesloten wordt dat het klinische product intacte of functionele EBV-sequenties bevat.

3. Voorgenomen klinische studie

Aan deze klinische studie zullen 1000 patiënten deelnemen. Er worden geen exclusiecriteria gehanteerd. De iMSC worden via infusie toegediend aan de patiënt door gebruik te maken van een perifere of centrale veneuze toegang. De patiënten zullen hiervoor 2 uur in het ziekenhuis verblijven en mogen daarna, als het ziektebeeld het toelaat, het ziekenhuis verlaten. Er worden standaard ziekenhuis-hygiënemaatregelen gevolgd bij toediening van iMSCs, en bij eventuele incidenten wordt de standaardprocedure gevolgd voor incidenten met humaan materiaal. Er zullen gedurende de studie monsters afgenomen worden, waaronder bloed, secreties, excreties en weefselbiopten. Deze worden uitgevoerd en verwerkt volgens de standaardprocedure van het ziekenhuis met inachtneming van standaard hygiënevoorschriften. Afval van het klinische product, of materiaal dat in contact geweest is met het klinische product, zal verwerkt worden als ‘specific hospital waste’ (UN3291). Besmet herbruikbaar materiaal zal worden geautoclaveerd of gedesinfecteerd met gevalideerde desinfectantia.

4. Eerder COGEM advies

In 2020 heeft de COGEM positief geadviseerd over een vergelijkbare brede aanvraag over de klinische toepassing van verschillende celproducten die afgeleid zijn van iPSCs.¹ Hierbij werden de iPSCs onderworpen aan een kwaliteitscontrole die bestond uit zowel PCR als ‘whole genome sequencing’ (WGS) om uit te sluiten dat er integratie van het plasmide (of fragmenten daarvan) heeft plaatsgevonden. De COGEM heeft destijds gesignaleerd 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-vergunningplicht valt. De reden hiervoor is dat, alhoewel bij de vervaardiging van de iPSCs episomale plasmiden toegepast worden, deze plasmiden na verloop van tijd verdwijnen en de eindproducten (de iPSC-afgeleide cellen) geen plasmide meer bevatten en geen sequentiewijzigingen hebben ondergaan.

Daarnaast heeft de COGEM 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.,6,7,8} Ook heeft zij in het verleden geadviseerd over een vereenvoudigde procedure voor gentherapiestudies met ‘naakt DNA’,⁹ 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 (waaronder afwezigheid van virale sequenties) en bij het opvolgen van de gestelde voorschriften, de milieurisico’s bij klinische studies met naakt DNA verwaarloosbaar klein zijn.

5. Overwegingen en advies

In de onderhavige aanvraag voor een klinische studie worden iMSCs, afgeleid van iPSCs, toegediend aan patiënten om functieverlies van weefsels of organen door immuundysregulatie te herstellen. De iMSCs worden geproduceerd door een externe partij en zijn afgeleid van iPSCs die verkregen zijn door transiënte transfectie van allogene humane somatische cellen met episomale plasmiden. Er wordt geen doelbewuste genetische modificatie toegepast om de iMSCs te verkrijgen, en de aanvrager acht het

gezondheidsrisico van toediening van iMSCs derhalve gelijk aan het gebruik/toepassen van andere humane cellen. Voorafgaand aan gebruik worden zowel de iPSCs als de iMSCs gecontroleerd op aanwezigheid van plasmidesequenties en op integratie van sequenties afkomstig van de plasmide. Met de gebruikte kwaliteitscontrole (PCR-test) is echter niet uit te sluiten dat er met zeer lage frequenties integratie van plasmidesequenties in het gastheergenoom is opgetreden. De COGEM merkt op dat de gevolgen van eventuele integratie voornamelijk een potentieel patiëntrisico betreft, omdat de iMSC-afgeleide cellen zich buiten het lichaam niet kunnen handhaven en derhalve niet verder kunnen verspreiden. Theoretisch gezien zou bij integratie van (gedeeltelijke) virale sequenties gedurende een opvolgende infectie met het desbetreffende virus recombinatie op kunnen treden. Deze kans acht de COGEM echter zeer klein. Met betrekking tot de onderhavige aanvraag acht de COGEM de kans dat bij uitwisseling van geïntegreerde virale genfragmenten met infecterend virus, ggo's ontstaan met nieuwe eigenschappen verwaarloosbaar klein, omdat hierbij alleen dezelfde virale sequenties uitgewisseld kunnen worden. Overigens wordt bij de PCR-test gebruik gemaakt van primers gericht op EBV-sequenties, waarmee uitgesloten wordt dat het eindproduct EBV-sequenties afkomstig van het plasmide bevat. Verder wordt door de aanvrager op basis van beperkte data uit de preklinische studie⁴ en gegevens uit een humane studie naar aanwezigheid van MSC in *post mortem* weefsel na behandeling met MSCs,¹⁰ verondersteld dat de iMSCs een korte levensduur hebben in de patiënt na toediening.

Het is niet volledig uit te sluiten dat derden (voornamelijk medisch personeel) onbedoeld blootgesteld kunnen worden aan het iMSC klinische product, bijvoorbeeld door bloedcontact bij snij- en prikincidenten. De aanvrager stelt dat het risico van onbedoelde blootstelling aan iMSCs voor derden eender is aan blootstelling aan reguliere humane cellen en dat deze cellen door het immuunsysteem van de ontvanger vernietigd zullen worden.

Met uitzondering van mogelijke zeldzame integratie van kleinere plasmidefragmenten, hebben de iMSCs geen wijzigingen ondergaan in het genoom. Van MSCs is bekend dat zij immunomodulerende eigenschappen hebben, die geïnduceerd kunnen worden door (combinaties van) cytokines die bij ontsteking van beschadigd weefsel geproduceerd worden.² Vanwege deze eigenschap kan niet met zekerheid gesteld worden dat bij onbedoelde blootstelling deze cellen (direct) door het immuunsysteem van de ontvanger vernietigd worden. De COGEM verwacht echter geen schadelijke effecten van onbedoelde blootstelling aan iMSC, omdat de iMSCs vergelijkbaar zijn met andere lichaamscellen en geen schadelijke genproducten bevatten.

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

6. Signalerende opmerking

De iPSCs waar de iMSCs van afgeleid zijn, zijn vervaardigd door middel van transfectie met een episomaal plasmide. Deze plasmide verdwijnt na verloop van tijd uit de gastheercel. De COGEM heeft bij een voorgaande toepassing van iPSC-afgeleide producten gesignaleerd dat er mogelijk discussie kan ontstaan of het terecht is dat deze klinische toepassing binnen het kader van de ggo-regelgeving, en daarmee onder de ggo-vergunningsplicht valt. Hoewel de gebruikte kwaliteitscontrole voor het

eindproduct (de iPSC-afgeleide iMSC) in de huidige aanvraag verschilt van de voorgaande aanvraag en daardoor niet uitgesloten kan worden dat de cellen in zeldzame gevallen kleine plasmidefragmenten bevatten, is het productieproces eender en spelen in de onderhavige vergunningaanvraag soortgelijke vragen een rol.

Mede gezien deze discussie is de COGEM voornemens te onderzoeken of het gewenst of noodzakelijk is, en daarnaast ook mogelijk is een advies met een generieke milieurisicobeoordeling uit te brengen over klinische studies naar de toepassing van iPSC(-afgeleide) producten. Het generieke advies zou als basis kunnen dienen om een vereenvoudigde vergunningprocedure (vergunning onder vaste voorwaarden (VoV)) voor klinische studies met iPSC(-afgeleide) producten op te stellen.

Referenties

1. COGEM (2020). Klinische studie naar de toepassing van celproducten afgeleid van geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC). COGEM advies CGM/201210-01
2. Wang Y *et al.* (2014). Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat. Immunol.* 15: 1009-1016
3. Bloor AJC *et al.* (2020). Production, safety and efficacy of iPSC-derived mesenchymal stromal cells in acute steroid-resistant graft versus host disease: a phase I, multicenter, open-label, dose-escalation study. *Nat. Med.* 26: 1720-1725
4. Ozay EI *et al.* (2019). Cymerus™ iPSC-MSCs significantly prolong survival in a pre-clinical, humanized mouse model of Graft-vs-host disease. *Stem Cell Res.* 35: 101401
5. Takahashi K & Yamanaka S (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17: 183-193
6. COGEM (2020). Gentherapiestudie met retroviraal getransduceerde T-cellen ter behandeling van CLDN6-positieve maligniteiten. COGEM advies CGM/200616-01
7. COGEM (2019). Klinische studie met lentiviraal getransduceerde CD34+ cellen ter behandeling van cerebrale adrenoleukodystrofie (CALD). COGEM advies CGM/191114-01
8. COGEM (2019). Generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met *ex vivo* retro- en lentiviraal getransduceerde cellen. COGEM advies CGM/190729-01
9. COGEM (2012). Vereenvoudiging procedure voor verlening vergunningen van klinische studies met naakt DNA. COGEM advies CGM/120927-01
10. Von Bahr L *et al.* (2012). Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. *Stem Cells* 30: 1575-1578