

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. B. Visser
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 02 december 2021
KENMERK CGM/211202-01
ONDERWERP Advies klinische studie gg-T-cellen met neoantigeen-specifieke TCR

Geachte mevrouw Visser,


Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag getiteld 'Application of nuclease-mediated TCR gene editing of an autologous T cell product targeting a limited number of tumor-specific neoantigens for the treatment of advanced solid tumors' (IM-MV 21-024_000) van het Nederlands Kanker Instituut, 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 (gg-)afweercellen in patiënten met terugkerende tumoren in organen of weefsel en/of uitzaaiingen. Voor de klinische studie worden lichaamseigen afweercellen (T-cellen) buiten het lichaam genetisch gemodificeerd met behulp van zogenaamde 'ribonuclease-complexen'. Na de aanpassing worden de gg-T-cellen weer toegediend aan de patiënt.

De ribonuclease-complexen bestaan uit nuclease-eiwitten in combinatie met RNA-sequenties, die samen met DNA-moleculen in de T-cel worden gebracht. Hierdoor wordt de oorspronkelijke receptor die op de T-cel aanwezig is (de TCR) veranderd in een tumor-specifieke receptor. Door de modificatie herkennen de gg-T-cellen de tumorcellen en zetten zij een afweerreactie in gang tegen de tumor. Voor iedere patiënt wordt een specifieke coderende DNA sequentie gebruikt waardoor de T-cellen zich richten op de tumor van die patiënt.

Bij het modificeren van de T-cellen kan het zijn dat niet alle ribonuclease-complexen in de T-cel opgenomen worden en aanwezig blijven in de suspensie. In celkweek worden de complexen na 48 uur nauwelijks nog waargenomen. In de patiënt/proefpersoon zal diens afweersysteem de resterende ribonuclease-complexen verwijderen. Ook de gg-T-cellen zelf kunnen residuele ribonuclease-complexen bevatten, echter overleven (gg-)T-cellen niet buiten het lichaam. Het bovenstaande in overweging nemende is de COGEM van oordeel is dat de risico's voor het milieu bij het uitvoeren van deze 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.
- Drs. Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's DG Milieu en Internationaal
 - Dr. ir. M.M.C. Gielkens, Loket Gentherapie
 - Dr. R.J. Vanmolkot, Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek
 - Drs. K.E. Kok, Ministerie van VWS

Klinische studie met gg-T-cellen, waarin de T-celreceptoren met behulp van nucleases zijn aangepast tegen neo-antigenen in solide tumoren

COGEM advies CGM/211202-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag (IM MV 21-024) voor een klinische studie met genetisch gemodificeerde (gg-)T-cellen ter behandeling van terugkerende solide tumoren en/of metastasen (uitzaaiingen). De aanvraag is afkomstig van het Nederlands Kanker Instituut in Amsterdam. In de klinische studie zijn lichaamseigen (autologe) T-cellen buiten het lichaam (*ex vivo*) gemodificeerd met behulp van ribonucleaseproteïne-complexen, waarbij de expressie van de endogene T-cel receptoren (TCR) is aangepast om patiënt-specifieke neo-antigenen te herkennen die in diens solide tumoren tot expressie komen. De klinische studie heeft als doel het testen van de effectiviteit, haalbaarheid en veiligheid van het medisch product, dat NT-125 is genoemd.

2. Samenstelling en productie van NT-125

De modificatie van de T-cellen is gericht op het vervangen van de T-cel receptor (TCR). TCR's bestaan uit twee ketens: de α en β keten, welke beide een constant deel en een variabel deel hebben. Het variabele deel bepaalt de antigeenspecificiteit. TCR's binden aan HLA-I receptoren op gastheercellen.

De autologe T-cellen worden *ex vivo* gemodificeerd met behulp van een nuclease-gemedieerde 'site-specific insertion' (SSI). Bij de *ex vivo* modificatie van de T-cellen worden middels electroporatie verschillende componenten aan de T-cellen toegediend. Ten eerste een ribonucleoproteïne (RNP) bestaande uit een nuclease en een 'single guide RNA' (sgRNA), dat gericht is op het creëren van een dubbelstrengs breuk in het TCR α locus (TRAC) in het cellulaire genoom. Ten tweede een RNP dat gericht is op het maken van een breuk in het nabijgelegen TCR β locus (TRBC). Ten derde worden DNA 'repair templates' toegevoegd. De door de RNP's veroorzaakte breuken worden door het cellulaire reparatiemechanisme gerepareerd, waarbij het DNA-fragment gelegen tussen de twee breuken vervangen kan worden door het DNA van de 'repair templates'. Hierdoor brengen de cellen recombinante TCR's tot expressie welke specifiek zijn voor de neo-antigenen die tot expressie komen in de tumor van de patiënt. De DNA 'repair templates' zijn patiënt-specifiek.

Een DNA 'repair template' bestaat uit meerdere onderdelen, zoals flankerende sequenties die homologoog zijn aan het TRAC-locus waardoor er sprake is van specifieke insertie in het TRAC locus. Daarnaast bestaat de template uit het variabele en constante domein van TCR β , een selectie-gen, en het variabele en een deel van het constante domein van TCR α . De variabele delen van TCR α en TCR β zijn patiëntspecifiek, en verantwoordelijk voor de neo-antigeen-specificiteit. Tevens is het constante domein van de β -keten gemodificeerd, wat tijdens het productieproces de detectie van de gg-T-cellen met antilichamen mogelijk maakt. Het selectiegen wordt gebruikt voor het selecteren van gg-T-cellen tijdens het vermeerderen of opkweken van de cellen. Daarnaast zijn de verschillende onderdelen van de DNA 'repair template' gescheiden door '2A self-cleaving' sequenties. Deze sequenties zijn afkomstig van de (strikt dierpathogene virussen *Teschovirus A* (ook bekend als Porcine teschovirus) en *Thosea asigna virus*.^{1,2} De virale sequenties leiden tot de productie van het 2A-peptide, die het mogelijk maakt om

verschillende eiwitten vanaf één transcript te produceren middels ‘ribosomal skipping’.³ Gemiddeld zijn 2A-peptides tussen de 18 en 22 aminozuren lang.³

In een als vertrouwelijk bestempeld onderdeel van de vergunningaanvraag, dat is ingezien door de COGEM, worden de RNP’s en DNA ‘repair templates’ nader gespecificeerd. In dit vertrouwelijke deel zijn tevens de sequenties van de DNA ‘repair templates’ opgenomen.

3. Bereiding van het medisch product NT-125

Voor de bereiding van NT-125 worden lichaamseigen T-cellen uit iedere patiënt verkregen. Aan de T-cellen worden middels electroporese de RNP’s en een gepersonaliseerde DNA ‘repair template’ toegevoegd. Iedere DNA ‘repair template’ wordt geverifieerd met behulp van Sanger-sequencing en aan de hand van migratiepatronen in (1% agarose) gelelectroforese. De sequentie wordt vergeleken met een referentiegenoom en de zuiverheid wordt getest met HPLC (High-performance liquid chromatography). De productie van de gg-T-cellen (NT-125) is reeds vergund onder Ingeperkt Gebruik en maakt derhalve geen deel uit van de voorliggende vergunningaanvraag.

Bij het gebruik van de *ex vivo* gemodificeerde T-cellen voor de klinische studie worden de cellen getest op zuiverheid en identiteit. Dit wordt vastgesteld met behulp van flowcytometrie. Hierbij wordt er gekeken naar de expressie van recombinante TCR’s met behulp van antilichamen die binden aan de TCRβ-merker.

4. Opzet van de klinische studie

Maximaal 100 proefpersonen zullen deelnemen aan de studie. De proefpersonen zullen twee dagen voorafgaand aan de therapie behandeld worden met ‘lymphodepletie’ chemotherapie, om de hoeveelheid endogene lymfocyten te verminderen. De gg-T-cellen zullen intraveneus worden toegediend aan de patiënt, met een dosis tussen de 1×10^8 en 1×10^{10} cellen. Na toediening zal de proefpersoon elke dag gedurende zeven dagen, recombinant interleukin-2 (rIL-2) ontvangen. Het rIL-2 induceert onder andere de proliferatie van de (gg-)T-cellen.⁴ De patiënt zal ten minste zeven dagen na toediening in het ziekenhuis verblijven, om mogelijk nadelige effecten van de behandeling te monitoren.

5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft onlangs positief geadviseerd over een klinische studie met allogene gg-T-cellen die *ex vivo* genetisch gemodificeerd waren met behulp van CRISPR-Cas9 RNP-complexen, waarna de cellen behandeld werden een adenovirus-associated virus (AAV)-vectoren.⁵ Tevens heeft de COGEM meerdere adviezen en een generieke milieurisicobeoordeling gepubliceerd over behandelingen met gg-T-cellen die met behulp van retro- of lentivirale vectoren ontwikkeld zijn.⁶

Daarnaast heeft de COGEM een advies uitgegeven over de risico’s voor derden bij klinische studies met gg-T-cellen.^{7,8} Naar aanleiding van dit advies worden eventuele mensgebonden risico’s van donatie van lichaamsmateriaal, zwangerschap, het geven van borstvoeding en moedermelkdonatie niet meer onder de vergunningverlening van gg-organismen (ggo’s) beoordeeld en geadresseerd.^{8,9}

6. Overweging

6.1 Moleculaire karakterisering

De COGEM heeft criteria opgesteld waaraan de moleculaire karakterisering van een ggo moet voldoen, bij een introductie in het milieu voor een klinische of veterinaire studie.¹⁰ Hierin staat dat de genetische wijzigingen door middel van sequentiebepaling vastgesteld moeten zijn. Hierbij dient de sequentieanalyse de regio van de beoogde wijziging te omvatten, tot in de flankerende sequenties van het genoom van het uitgangsgenoom.

NT-125 is een gepersonaliseerd medisch product, bestaande uit lichaamseigen T-cellen die *ex vivo* gemodificeerd zijn met RNP's en gepersonaliseerde DNA 'repair template'. Van iedere DNA 'repair template' wordt de sequentie bepaald en geverifieerd. De sequentie van het uiteindelijke product, de gepersonaliseerde gg-T-cellen, wordt niet gecontroleerd. Hierdoor kan er niet met zekerheid gesteld worden dat de gg-T-cellen de beoogde genetische modificaties bezitten. Gezien T-cellen buiten de gastheer niet kunnen overleven, is de COGEM van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat deze beperking in de moleculaire karakterisering van de gg-T-cellen van invloed zal zijn op de milieurisico-analyse. De COGEM is van mening dat de DNA 'repair template' goed gekarakteriseerd zijn en geen risico vormen voor het milieu. De COGEM acht het medisch product NT-125 voldoende moleculair gekarakteriseerd.

6.2 Het optreden van recombinatie met virale sequenties

Elke DNA 'repair template' bevat virale '2A self cleaving' sequenties afkomstig van het *Teschovirus A* en het *Thosea asigna virus*. Hierdoor bevat iedere gg-T-cel een zeer korte virale sequentie die codeert voor het virale 2A peptide. In theorie zou er door de homologe sequenties recombinatie kunnen plaatsvinden tussen het virus en de gg-T-cel of tussen het virus en de DNA 'repair template'. Beide virussen hebben echter dieren (varkens en vlieders) als primaire gastheer, en infecties bij de mens zijn nooit waargenomen. Hierdoor is de kans verwaarloosbaar klein dat de virussen in contact komen met het DNA van de gg-T-cel of met de DNA 'repair template' indien dit zich nog in de gg-T-cel bevindt. De COGEM acht de kans op recombinatie tussen de wildtype virussen en de ingebrachte sequenties in de gg-T-cellen, dan wel tussen de virussen en de DNA 'repair template', verwaarloosbaar klein.

6.3 Aanwezigheid van residuele RNP's en DNA 'repair templates' in het medisch product

Voor de productie van het medisch product NT-125 worden autologe T-cellen *ex vivo* geëlectroporeerd, waarmee RNP's en een DNA 'repair template' in de cellen worden geïntroduceerd. In de celkern modificeren zij het DNA van de T-cel. Bij het electroporeren van de T-cellen kunnen losse RNP's of DNA-strengen buiten de cel achterblijven, waardoor deze componenten aanwezig kunnen zijn in de vloeistof rond de gg-T-cellen. In theorie zouden hierdoor residuele RNP's of DNA 'repair templates' kunnen meekomen bij het toedienen van het medisch product aan de patiënt. Een DNA 'repair template' is naakt DNA, en heeft in het cytoplasma van *ex vivo* gecultiveerde humane cellen een halfwaardetijd tussen de 50 minuten en 5 uur.¹¹ RNP's s zijn na 24 uur in *ex vivo* gecultiveerde cellen nog nauwelijks detecteerbaar, en na 48 uur niet meer aan te tonen via 'western blotting'.¹² In de aanvraag is niet gespecificeerd hoe lang de kweekperiode van de gg-T-cellen is, voordat zij aan de patiënt worden toegediend.

Indien er residuele RNP's meekomen bij het toedienen van het medisch product aan de patiënt, zullen de RNP's waarschijnlijk door het afweersysteem van de ontvanger als lichaamsvreemd worden aangemerkt en verwijderd. In bijvoorbeeld het geval van het RNP CRISPR-Cas9, zijn er reeds bestaande antilichamen tegen Cas9-eiwitten gevonden (vermoedelijk verkregen via blootstelling aan bacteriële Cas9 varianten) en humorale afweerreacties waargenomen in gezonde personen.^{13,14,15} Het is onbekend of RNP's uitgescheiden kunnen worden door de patiënt. De RNP's bevatten geen eigenschappen om actief cellen binnen te dringen, waardoor het risico op schade aan het DNA door mogelijk aanwezige residuele RNP's, verwaarloosbaar klein is.

De COGEM is van mening dat er niet kan worden uitgesloten dat er losse RNP's of DNA 'repair templates' aanwezig zijn in het medisch product. De kans dat deze componenten gedurende langere tijd aanwezig zijn in de patiënt, acht de COGEM verwaarloosbaar klein.

6.4 Aanwezigheid van residuele RNP's en DNA 'repair templates' in de gg-T-cellen

In het eindproduct kunnen residuele RNP's en DNA 'repair templates' ook aanwezig blijven in de gg-T-cellen zelf. Echter kunnen (gg-)T-cellen zich buiten het lichaam niet handhaven en worden ze niet uitgescheiden via speeksel, urine of feces. Wanneer de gg-T-cellen terecht zouden komen in derden, worden de gg-T-cellen als lichaamsvreemd aangemerkt en vernietigd.

Het bovenstaande in overweging nemend, acht de COGEM de risico's voor het milieu bij een klinische studie met gg-T-cellen die mogelijk residuele RNP's en/of DNA 'repair templates' bevatten, verwaarloosbaar klein.

7. Advies

Het medisch product NT-125 bestaat uit lichaamseigen T-cellen die *ex vivo* gemodificeerd zijn met RNP's en patiënt-specifieke DNA 'repair templates'. Er kan niet worden uitgesloten dat er residuele RNP's of DNA 'repair templates' aanwezig zijn in het medisch product. De kans dat deze componenten voor langere tijd aanwezig zijn in de patiënt, en dat derden aan de RNP's worden blootgesteld, acht de COGEM verwaarloosbaar klein. De gg-T-cellen zelf kunnen zich niet handhaven buiten het lichaam en kunnen zich niet verspreiden.

Op basis van het bovenstaande, is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met gepersonaliseerde gg-T-celtherapie, bestaande uit autologe gg-T-cellen die *ex vivo* gemodificeerd zijn met behulp van RNP's en DNA 'repair templates', verwaarloosbaar klein zijn.

8. Signalerende opmerking

De COGEM heeft eerder opgemerkt dat gg-T-cellen kunnen worden overgedragen aan derden door donatie van lichaamsmateriaal, zwangerschap, het geven van borstvoeding en moedermelkdonatie.⁸ Destijds is besloten dat deze risico's niet meer onder de vergunningverlening van ggo's worden beoordeeld en geadresseerd.^{8,9} De COGEM wijst erop 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 patiënten hebben ondergaan, zodat zij dit in hun overwegingen mee kunnen nemen.

9. Algemene opmerking

De COGEM merkt op dat een deel van de vergunningaanvraag, betreffende specificaties van RNP's en DNA 'repair templates', als vertrouwelijk is bestempeld. Deze informatie is door de COGEM ingezien en in de overweging meegenomen. In de tekst van het onderhavige COGEM advies is wegens de vertrouwelijkheid enkel in globale zin ingegaan op de totstandkoming van het medisch product.

Referenties

1. COGEM (2019). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/190915-02
2. COGEM (2006). Pathogeniteitsclassificatie van het *Hendra virus*, *Nipah virus*, *Equid alphaherpesvirus 4*, *Equine rhinitis A virus*, *Teschovirus A* en *Thosea asigna virus*. COGEM advies CGM/160706-01
3. Kim JH *et al.* (2011). High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PloS one* 6: e18556
4. Maus MV *et al.* (2014). Adoptive immunotherapy for cancer or viruses. *Annu. Rev. Immunol.* 32: 189–225
5. COGEM (2020). Klinische studie met allogene *ex vivo* recombinant AAV-vector getransduceerde T-cellen (CTX130). COGEM advies CGM/201029-01
6. COGEM (2019). Generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met *ex vivo* retro- en lentiviraal getransduceerde cellen. COGEM advies CGM/190729-01
7. COGEM (2019). Immunotherapie met genetisch gemodificeerde T-cellen: onbedoelde blootstelling en potentiële risico's. COGEM signalering CGM/190227-01
8. COGEM (2020). Beoordeling van risico's voor derden bij genterapiestudies met replicatie-deficiënte ggo's en gg-T-cellen. COGEM advies CGM/2000123-01
9. Minister van Infrastructuur en Waterstaat (2020). Beleidsnota Biotechnologie 27428, nr. 366. <https://zoek.officielebekendmakingen.nl/kst-27428-366.html> (bezoekt op 11 november 2021)
10. COGEM (2013). Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing. COGEM advies CGM/130227-05
11. Vaughan EE *et al.* (2006). Intracellular trafficking of plasmids for gene therapy: mechanisms of cytoplasmic movement and nuclear import. *Curr. Gene Ther.* 6: 671–681
12. Kim S *et al.* (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome res.* 24: 1012–1019
13. Charlesworth CT *et al.* (2019). Identification of pre-existing adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat. Med.* 25: 249–254
14. Simhadri VL *et al.* (2018). Prevalence of Pre-existing Antibodies to CRISPR-Associated Nuclease Cas9 in the USA Population. *Mol. Ther. Methods. Clin. Dev.* 10: 105–112
15. Wagner DL *et al.* (2019). High prevalence of *Streptococcus pyogenes* Cas9-reactive T cells within the adult human population. *Nat. Med.* 25: 242–248