

Aan de staatssecretaris van Openbaar Vervoer en Milieu  
Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat  
Ch.A. Jansen  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 21 oktober 2024  
**KENMERK** CGM/241021-01  
**ONDERWERP** Advies klinische studie met *ex vivo* lentiviraal getransduceerde CAR T-cellen

Geachte heer Jansen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over vergunningsaanvraag IM-MV 24-011\_000 getiteld 'Lentiviral transduced human cells to treat human diseases', ingediend door het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC), deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**


De COGEM is gevraagd te adviseren over de milieurisico's van een klinische studie met *ex vivo* (buiten het lichaam) genetisch gemodificeerde (gg-)T-cellen die zullen worden toegediend aan patiënten. De gg-T-cellen kunnen zowel autoloog (lichaamseigen) als allogeen (lichaamsvreemd) zijn. De aanvrager is voornemens om cellen *ex vivo* te transduceren, wat leidt tot gg-cellen met 'chimere antigeen receptoren' (CAR) om zo bepaalde ziektes te behandelen. De lentivirale vectoren die gebruikt worden zijn 3<sup>e</sup> generatie zelf-inactiverende ('self-inactivating'; SIN) vectoren gebaseerd op het lentivirus human immunodeficiency virus 1 (HIV-1).

De COGEM heeft in 2020 een advies uitgebracht met een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische studies met cellen die *ex vivo* getransduceerd zijn met lenti- of retrovirale vectoren. De in de onderhavige studie gebruikte gg-T-cellen voldoen aan de criteria van deze generieke milieurisicobeoordeling, behalve dat de lentivirale vector een hybride promotor kan bevatten waarin een klein deel van het humaan T-lymfotroop virus type 1 (HTLV-1) aanwezig is.

Op basis van de aangeleverde informatie is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen klinische studie met gg-T-cellen, die gemaakt zijn met een lentivirale vector waarin een stukje HTLV-1 sequentie aanwezig is, 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 Getherapie
- Dr. K.R.J. Vanmolkot, Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek
- Drs. K.E. Kok, Ministerie van VWS

*Met het oog op eventuele belangenverstremeling zijn de COGEM-leden prof. dr. R.C. Hoeben en dr. M.C.W. Feltkamp niet betrokken geweest bij de besluitvorming van dit advies.*

# Klinische studie met allogene en autologe *ex vivo* lentiviraal getransduceerde CAR T-cellen

## COGEM advies CGM/241021-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een klinische studie met autologe en allogene genetisch gemodificeerde (gg-) 'Chimeric Antigen Receptor' (CAR) T-cellen, die zullen worden toegediend aan patiënten ter behandeling van humane ziektes (IM-MV 24-011). De aanvraag is afkomstig van het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC). De gebruikte CAR-T-cellen worden geproduceerd door T-cellen *ex vivo* te transduceren met lentivirale deeltjes, waardoor deze een CAR tot expressie brengen. De lentivirale vectoren die gebruikt worden zijn 3<sup>e</sup> generatie 'self-inactivating' (SIN) vectoren gebaseerd op het lentivirus Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). Deze lentivirale vectoren kunnen een promotor bevatten waarin een klein deel van de Long Terminal Repeat (LTR) van humaan T-lymfotroop virus type 1 (HTLV-1) aanwezig is, die de transcriptie van CAR versterkt.

### 2. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische studies met *ex vivo* lentiviraal getransduceerde cellen waarbij gebruik gemaakt wordt van een 3<sup>e</sup> generatie SIN lentiviraal vectorsysteem op basis van HIV-1, opgesteld en geoordeeld dat de milieurisico's hiervan verwaarloosbaar klein zijn, mits er aan onderstaande randvoorwaarden voldaan is:<sup>1,2</sup>

- Het gebruikte transgen codeert niet voor sequenties die in staat zijn de replicatie-deficiënte lentivirale vector te complementeren, of voor schadelijke genproducten of (proto)oncogenen. Ook mogen o.a. virale promotor-, niet-virale intron-, IRES en ribosomale skip-sequenties aanwezig zijn in de transfervector, mits hiervoor geen lenti- of retrovirale sequenties worden gebruikt;
- Voor de moleculaire karakterisering geldt dat minimaal de vectorkaartjes en beschrijvingen van de productieplasmiden zijn overlegd door de aanvrager, en dat de aanvrager heeft bevestigd dat deze plasmiden gesequenced zijn en dat de retrovirale of lentivirale sequenties in de plasmiden identiek zijn aan de beoogde sequenties.

Het medisch product in het onderhavig advies betreft lentivirale vectordeeltjes. Voor studies met lentivirale vectoren zijn generieke maatregelen gesteld wanneer de aanwezigheid van vrije lentivirale vectordeeltjes niet uitgesloten kan worden<sup>3</sup>:

- Na toediening van de *ex vivo* lentiviraal getransduceerde gg-cellen blijft de patiënt minimaal 16 uur in het ziekenhuis opgenomen, zodat de geëigende standaard ziekenhuishygiënische maatregelen in acht genomen kunnen worden;
- Na toediening van het medisch product wordt de infuusinsteekplaats met een adequate methode gedesinfecteerd om resterende cellen en vectordeeltjes te inactiveren, en worden de geëigende standaard ziekenhuishygiënische maatregelen tijdens de verzorging van de patiënt in acht genomen;

- Patiënt, en medisch personeel en bezoekers worden voorgelicht hoe de eerste 16 uur na toediening van het medisch product er ten aanzien van wondverzorging en besmet materiaal moet worden omgegaan.
- Het uitsluiten van HIV-1 en -2 patiënten bij klinische studies met lentivirale vectoren is vervallen als randvoorwaarde van de generieke milieurisicobeoordeling.<sup>1</sup>

### 3. Informatie over de klinische studie en het medisch product

In totaal worden maximaal 1000 proefpersonen behandeld met *ex vivo* lentiviraal getransduceerde, autologe en/of allogene T-cellen die een chimere antigen receptor (CAR) tot expressie brengen om ziektes te behandelen. Het onderzoek zal plaatsvinden in het LUMC. De productie van deze lentivirale vector valt buiten deze aanvraag. De aanvrager heeft aangegeven de lentivirale vector op twee manieren te kunnen vervaardigen. Bij één van de productieprocessen zijn er volgens de aanvrager in het eindproduct geen vrije deeltjes meer aanwezig; bij gebruik van de andere productiemethode kunnen er tot maximaal  $1 \times 10^{12}$  vrije deeltjes in het eindproduct aanwezig zijn. Ongeacht de productiemethode zullen de gg-T-cellen intraveneus worden toegediend. Wanneer er in het toegediende medisch product vrije vectordeeltjes aanwezig zijn, zal de aanvrager aanvullende maatregelen toepassen. Deze maatregelen komen overeen met de maatregelen zoals de COGEM deze heeft gesteld voor medische producten waarin vrije lentivirale vectordeeltjes aanwezig zijn.<sup>1</sup>

Het medisch product bestaat uit autologe of allogene gg-T-cellen die een CAR tot expressie brengen. Om het transgen in de T-cellen tot expressie te brengen worden deze getransduceerd met een lentivirale vector. De lentivirale vector die gebruikt wordt, wordt vervaardigd door transfectie van ‘human embryonic kidney’ (HEK) 293T cellen met een 3<sup>e</sup> generatie replicatie-deficiënt SIN lentiviraal vectorsysteem gebaseerd op HIV-1. De ‘transfervector’, die het gewenste transgen bevat, wordt geflankeerd door de virale 5’- en 3’-LTR sequenties. Ook bevat het construct het ‘packaging’-signaal  $\Psi$ , zodat het transgen in de vectordeeltjes wordt ingepakt. De expressie van de CAR wordt gereguleerd door óf een promotor gebaseerd op de promotor van het humane gen ‘Elongation Factor 1 $\alpha$ ’ (*EF1 $\alpha$* ), óf een hybride promotor die bestaat uit de kern van de *EF1 $\alpha$* -promotor en een klein deel van de LTR-sequentie van HTLV-1. Wanneer geen HTLV-1 sequentie in de *EF1 $\alpha$* -promotor (en dus in de lentivirale vector) aanwezig is, valt deze onder de generieke milieurisicobeoordeling. Naast de transfervector en twee packagingplasmiden, bestaat het productiesysteem uit een pseudotyperend plasmide. Van nature infecteert HIV-1 de verschillende cellen van het immuunsysteem zoals T-lymfocyten, macrofagen en monocytten. Voor een bredere toepasbaarheid van lentivirale vectoren is het gastheerbereik uitgebreid door pseudotypering van de lentivirale deeltjes met het oppervlakte-eiwit G van *Vesiculovirus indiana* (voorheen Vesicular stomatitis Indiana virus; VSIV, ook wel VSV genoemd).

Het Human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1, speciesnaam: *Primate T-lymphotropic virus 1*) behoort tot het genus *Deltaretrovirus* uit de subfamilie *Orthoretrovirinae* en familie *Retroviridae*.<sup>4,5</sup> HTLV-1 veroorzaakt in 5% van de geïnfecteerden volwassen T-cel-leukemie/lymfoom. In 3% leidt infectie tot HTLV-1 geassocieerde myelopathie.<sup>6,7</sup> Daarnaast wordt HTLV-1 geassocieerd met auto-

immuunziektes zoals uveïtis, polymyositis en artritis. In Nederland is de prevalentie van HTLV laag met 0-10 gevallen per 100.000 nieuwe bloeddonoren.<sup>8,9,10</sup>

#### **4. Overweging**

De COGEM heeft randvoorwaarden gedefinieerd bij de generieke milieuriscobeoordeling voor klinische studies met *ex vivo* lentiviraal getransduceerde cellen. De onderhavige klinische studie betreft een aanvraag voor het gebruik van T-cellen die *ex vivo* getransduceerd worden met 3<sup>e</sup> generatie SIN-lentivirale deeltjes. De lentivirale vectoren die gebruikt worden kunnen een promotor bevatten waarin een deel van de HTLV-1 LTR aanwezig is. Daarmee wijkt deze klinische studie af van de generieke randvoorwaarden.

##### **4.1 Moleculaire karakterisering van de lentivirale vector**

In de onderhavige aanvraag zijn vectorkaartjes en beschrijvingen van de productieplasmiden in de aanvraag overlegd. De aanvrager geeft aan dat de identiteit van de het complete vectorgenoom door middel van sequenzen bevestigd is en identiek is bevonden aan de beoogde sequenties.

De COGEM is van oordeel dat de aanvrager de moleculaire karakterisering voldoende heeft uitgevoerd en voldoet aan de eisen die zij hiervoor heeft gesteld.<sup>11</sup>

##### **4.2 Replicatie-competent lentivirus (RCL)**

Een mogelijk risico bij de productie van lentivirale vectordeeltjes is het ontstaan van RCL. In theorie zou RCL kunnen ontstaan door recombinatie tussen de lentivirale sequenties afkomstig van de verschillende plasmiden benodigd voor de productie van de virale vectordeeltjes, of van de vector met endogene retrovirussequenties die in het genoom van de gebruikte cellijn aanwezig zijn. Echter, de COGEM heeft gesteld dat in de wetenschappelijke literatuur nooit meldingen zijn geweest van de aanwezigheid van RCL bij gebruik van een 3<sup>e</sup> generatie SIN productiesysteem.<sup>12,13,14</sup> In het verleden heeft de COGEM gesteld dat vorming van RCL tijdens de productie van 3<sup>e</sup> generatie SIN lentivirale vectoren niet mogelijk is,<sup>15</sup> en een RCL test daarom niet noodzakelijk is.<sup>16</sup>

De expressie van het transgen uit de 3<sup>e</sup> generatie SIN lentivirale vector kan gereguleerd worden door een hybride promotor die bestaat uit een deel van de promotor van *EF1 $\alpha$*  en daarnaast een klein deel van de LTR van HTLV-1. De korte LTR-sequentie versterkt de transcriptie van het transgen, de chimere antigen receptor, maar vertoont zelf geen promotoractiviteit. Deze HTLV-1 sequentie kan niet compenseren voor één van de HIV-factoren die afwezig zijn in het lentivirale vectorsysteem (geen complementatie). Recombinatie van de HTLV-1 sequentie met één van de HIV-1 sequenties aanwezig in het lentivirale vectorsysteem is niet waarschijnlijk, gezien de gelimiteerde homologie tussen HTLV-1 en HIV-1 en de geringe grootte van de gebruikte HTLV-1 sequentie. Derhalve zal de aanwezigheid van de HTLV-1 sequentie de kans op recombinatie en vorming van RCL tijdens productie niet vergroten. De COGEM is van oordeel dat de kans op aanwezigheid van RCL, afkomstig uit het productiesysteem in het medisch product, verwaarloosbaar klein is.

#### **4.3 Aanwezigheid van een korte HTLV-1 sequentie in het eindproduct**

De aanwezigheid van de korte HTLV-1 sequentie in de lentivirale transfervector zou theoretisch gezien kunnen leiden tot recombinatie van deze transfervector met HTLV-1, indien de cellen geïnfecteerd worden door dit virus. Recombinatie tussen de transfervector en het HTLV-1 genoom zou in theorie kunnen optreden tijdens het reverse transcriptieproces. Om dit te bewerkstelligen moet de transfervector eerst geproduceerd worden en daarna samen met een HTLV-1 genoom in één virusdeeltje ingepakt worden – zogenaamde ‘co-packaging’ – waarna dit virusdeeltje een cel infecteert. Productie van de lentivirale vector is niet efficiënt omdat een SIN lentivirale vector wordt gebruikt. Co-packaging is waarschijnlijk niet efficiënt en er is geen literatuur bekend die co-packaging van HTLV-1 met andere humane lentivirussen rapporteert.<sup>17</sup> Bovendien is de prevalentie van HTLV-1 in Nederland laag, met 0-10 gevallen per 100.000 nieuwe bloeddonoren.<sup>8,9,10</sup> Recombinatie van de transfervector met HTLV-1 virus is derhalve onwaarschijnlijk.

Gezien de geringe sequentieovereenkomst van de korte HTLV-1 sequentie in de lentivirale transfervector met het HIV-1 virus, is het ook onwaarschijnlijk dat - bij infectie van de cellen met HIV-1 - de aanwezigheid van deze sequentie de kans op recombinatie van de lentivirale transfer vector met HIV-1 zal vergroten.

De HTLV-1 sequentie zal in de getransduceerde cellen ook aanwezig zijn in de RNA-transcripten die geproduceerd worden vanaf de chimere *EF1a*-promotor en die coderen voor de CAR. Deze transcripten bevatten geen packagingsignaal en kunnen derhalve niet in eventuele virusdeeltjes verpakt worden bij infectie van de cellen met HTLV-1. Recombinatie van RNA-transcripten met HTLV-1 is daarom onwaarschijnlijk. Recombinatie met eventueel aanwezig HIV-1 in de te transduceren cellen is ook onwaarschijnlijk vanwege de zeer geringe sequentie overeenkomsten

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij eventuele aanwezigheid van de korte HTLV-1 sequenties in het medisch product, verwaarloosbaar klein zijn.

#### **4.4 Aanwezigheid van vrije lentivirale vectordeeltjes in het eindproduct**

De aanvrager heeft aangegeven de lentivirale vector op twee manieren te kunnen vervaardigen. Bij één van de productieprocessen zijn er volgens de aanvrager in het eindproduct geen vrije deeltjes meer aanwezig; bij gebruik van de andere productiemethode kunnen er tot maximaal  $1 \times 10^{12}$  vrije deeltjes in het eindproduct aanwezig zijn. Wanneer gg-T-cellen worden gebruikt die via deze tweede productiemethode zijn vervaardigd, hanteert de aanvrager de generieke maatregelen zoals de COGEM deze heeft opgesteld wanneer de aanwezigheid van vrije lentivirale vectordeeltjes niet uitgesloten kan worden.<sup>1</sup>

Wanneer gebruik wordt gemaakt van de eerste productiemethode, waarbij volgens de aanvrager geen vrije vectordeeltjes in het eindproduct aanwezig zijn, is de COGEM er voorstander van dat aanvragers experimenteel onderzoeken of er vrije vectordeeltjes in *ex vivo* getransduceerde celsuspensies aanwezig zijn. Zij is van mening dat, als er geen gevalideerde test is aangeleverd, een theoretische benadering van de hoeveelheid vrije deeltjes aan de hand van een berekening inzicht geeft in de waarschijnlijkheid dat

er nog vrije deeltjes aanwezig zijn. Dit kan bepaald worden door bijvoorbeeld het gebruik van de COGEM-formule.<sup>18</sup>

De aanvrager heeft een aangepaste COGEM-formule toegepast om de hoeveelheid vrije virusdeeltjes in het medisch product te bepalen. Op basis van de gebruikte virustiter voor vervaardiging van het eindproduct, de vijf dagen tussen transductie en het oogsten van de gg-T-cellen, de halfwaardetijd van het VSV-G pseudotyperingseiwit (halfwaardetijd reductiefactor 0,7<sup>18</sup>) en het aantal wasstappen, concludeert de aanvrager dat de totale reductieratio 1,02 betreft. Dit komt overeen met minder dan 1 (0,98) theoretisch vrij vectordeeltje in het uiteindelijke medische product. Op grond van deze berekening is de COGEM van oordeel dat de kans verwaarloosbaar klein is dat bij de bovengenoemde eerste productiemethode in het eindproduct vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes aanwezig zijn.

## 5. Conclusie en advies

De COGEM heeft in het verleden een generieke milieurisicobeoordeling uitgebracht voor klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen, verkregen met een retro- of lentivirale vector.<sup>1</sup> Van klinische studies die aan de hierin genoemde voorwaarden voldoen, is het milieurisico verwaarloosbaar klein. De COGEM stelt vast dat de in de voorgenomen klinische studie te gebruiken gg-T-cellen voldoen aan de criteria van de generieke milieurisicobeoordeling, behalve dat de lentivirale vector in de huidige aanvraag een hybride promotor kan bevatten waarin een deel van het LTR van HTLV-1 aanwezig is.

De COGEM is van oordeel dat de lentivirale vector afdoende moleculair is gekarakteriseerd. Zij is van oordeel dat de kans verwaarloosbaar klein is dat er RCL in het toe te dienen product aanwezig is en dat derden aan vrije vectordeeltjes worden blootgesteld. Met betrekking tot de in het medisch product aanwezige HTLV-1 sequentie, zijn op basis van de aangeleverde informatie de milieurisico's van deze sequentie in het medisch product voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen klinische studie met lentiviraal getransduceerde CAR T-cellen verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. COGEM (2020). Advies betreffende procedures van markttoelatingen van medische ggo-producten die onder de generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies vallen. COGEM advies CGM/201214-02
2. COGEM (2024). Generiek advies over elementen in lenti- en retrovirale vectoren. COGEM advies CGM/240612-01
3. COGEM (2020). Generiek advies over de milieurisicobeoordeling van klinische studies met *ex vivo* lentiviraal getransduceerde cellen: aanwezigheid van vrije vectordeeltjes in het medisch product. COGEM advies CGM/200507-01
4. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) taxonomy. Taxonomy of *Primate T-lymphotropic virus 1*. [https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202204999](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202204999) (bezocht op 6 september 2024)
5. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) taxonomy. Taxonomy of *Primate T-lymphotropic virus 2*. [https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202205000](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202205000) (bezocht op 6 september 2024)

6. Verdonck K *et al.* (2007). Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect. Dis.* 7: 266-281
7. Proietti FA *et al.* (2005). Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24: 6058-60682
8. Zaaijer HL *et al.* (1994). Results of 1-year screening of donors in The Netherlands for human T-lymphotropic virus (HTLV) type I: significance of Western blot patterns for confirmation of HTLV infection. *Transfusion* 34: 877-880
9. Prinsze FJ & Zaaijer HL (2011). The outcome of donor screening for Human T-Cell lymphotropic virus infection in the Netherlands. *Vox Sang.* 102: 198-203
10. Slot E *et al.* (2016). Two decades of risk factors and transfusion-transmissible infections in Dutch blood donors. *Transfusion* 56: 203-214
11. COGEM (2013). Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing. COGEM advies CGM/130227-05
12. Marcucci, KT *et al.* (2018). Retroviral and lentiviral safety analysis of gene-modified t cell products and infused HIV and oncology patients. *Mol. Ther.* 26: 269-279
13. Sastry L *et al.* (2003). Certification assays for HIV-1-based vector: frequent passage of gag sequences without evidence of replication-competent viruses. *Mol. Ther.* 8: 830-839
14. Cornetta K *et al.* (2018). Absence of replication competent lentivirus in the clinic: analysis of infused T cell products. *Mol. Ther.* 26: 280-288
15. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. COGEM advies CGM/090331-03
16. COGEM (2019). Generieke milieurisicobeoordeling voor klinische studies met ex vivo getransduceerde cellen. COGEM advies CGM/190729-01
17. Hanson HM *et al.* (2022). Human retrovirus genomic RNA packaging. *Viruses* 14: 1094
18. Dautzenberg IJC & Hoeben RC (2019). The COGEM formula revisited. Experimental validation of the reduction ratio formula for three lentiviral particles. COGEM onderzoeksrapport CGM/2020-01