

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

DATUM 20 maart 2025
KENMERK CGM/250320-01
ONDERWERP Advies klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen (extra plasmide)

Geachte heer Jansen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over dossier IM-MV 24-020_000 getiteld 'A Phase 3, Randomized, Open-Label, Multicenter Study to Compare the Efficacy and Safety of BMS-986393, a GPRC5D-directed CAR-T Cell Therapy, Versus Standard Regimens in Adult Participants with Relapsed or Refractory and Lenalidomiderefractory Multiple Myeloma', van het Universitair Medisch Centrum Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

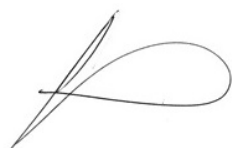
Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de milieurisico's van een klinische studie waarbij afweercellen van de patiënt buiten het lichaam genetisch gemodificeerd worden. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een speciaal ontworpen verzwakt virus, gebaseerd op HIV-1 maar zonder de schadelijke genen, dat genetisch materiaal in cellen kan brengen en zich niet verder kan verspreiden: de lentivirale vector. De genetisch gemodificeerde (gg-) afweercellen worden zo aangepast dat ze in staat zijn om kankercellen te herkennen en te vernietigen.

De COGEM heeft in het verleden een generieke milieurisicobeoordeling uitgevoerd voor klinische studies met dergelijke gg-cellen. Deze studie wijkt echter af van de destijds gestelde criteria, omdat om de productie van de lentivirale vector te vergroten, een extra onderdeel (een plasmide) is gebruikt. Op basis van informatie die de aanvrager heeft aangeleverd, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er een lentivirale vector kan ontstaan die kan verspreiden. Er is niet genoeg informatie om uit te sluiten dat er nog overgebleven lentivirale vectordeeltjes aanwezig zijn in de gg-afweercellen wanneer deze worden toegediend aan de patiënt. Mits er bewezen wordt dat er geen vectordeeltjes in het eindproduct zitten, of er voldaan wordt aan een aantal (generieke) maatregelen, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu 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 Genterapie
- Dr. K.R.J. Vanmolkot, Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek
- Drs. K.E. Kok, Ministerie van VWS
- Drs. W.T. Leijs, Ministerie van VWS

Met het oog op belangenverstrengeling is het COGEM lid dr. M.B. Ekkelenkamp niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Advies Klinische studie met gg-T-cellen verkregen met een lentivirale vector geproduceerd in aanwezigheid van een extra plasmide

COGEM advies CGM/250320-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een klinische studie met autologe genetisch gemodificeerde (gg) 'Chimeric Antigen Receptor' (CAR) T-cellen, die zullen worden toegediend aan patiënten ter behandeling van recidiverend of refractair en lenalidomide-refractair multipel myeloom (IM-MV 24-020). De aanvraag is afkomstig van het Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMCU). De gebruikte CAR-T-cellen worden geproduceerd door T-cellen van de patiënt *ex vivo* te transduceren met lentivirale deeltjes, waardoor deze een CAR tot expressie brengen. De lentivirale vectoren die gebruikt worden zijn 3^e generatie 'self-inactivating' (SIN) vectoren gebaseerd op het lentivirus human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). Deze lentivirale vectoren bevatten een promotor 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. Ook wordt tijdens het productieproces gebruikt gemaakt van een extra plasmide om de lentivirale titer te verhogen.

2. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft een generieke milieurisicobeoordeling opgesteld voor klinische studies met *ex vivo* lentiviraal getransduceerde cellen waarbij gebruik gemaakt wordt van een 3^e generatie SIN lentiviraal vectorsysteem op basis van HIV-1, en geoordeeld dat de milieurisico's hiervan verwaarloosbaar klein zijn, mits er aan onderstaande randvoorwaarden voldaan is:^{1,2,3,4}

- 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-, Internal ribosome entry site (IRES) en ribosomale skip-sequenties aanwezig zijn in de transfervector, mits hiervoor geen lenti- of retrovirale sequenties worden gebruikt³ (met uitzondering van specifieke lenti- of retrovirale promotorsequenties⁴);
- 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.

Voor studies met lentivirale vectoren zijn generieke maatregelen gesteld wanneer de aanwezigheid van vrije lentivirale vectordeeltjes niet uitgesloten kan worden:⁵

- 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, 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.¹ Daarnaast heeft de COGEM een advies uitgegeven over de risico's voor derden bij klinische studies met gg-T-cellen.^{6,7} 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.^{7,8}

3. Informatie over de klinische studie en het medisch product

In totaal zullen maximaal 440 proefpersonen behandeld worden met *ex vivo* lentiviraal getransduceerde, autologe T-cellen die een 'chimere antigeen receptor' (CAR) tot expressie brengen om de effectiviteit van deze behandeling te onderzoeken voor patiënten met recidiverend of refractair en lenalidomide-refractair multipel myeloom. Het onderzoek zal plaatsvinden in het UMCU. De productie van deze lentivirale vector valt buiten deze aanvraag. De gg-T-cellen zullen intraveneus worden toegediend.

Het medisch product, BMS-986393 bestaat uit autologe gg-T-cellen die een CAR tot expressie brengen gericht op het 'G protein-coupled receptor class C, group 5, member D'(GPCR5D). GPCR5D komt voornamelijk tot expressie in multiple myeloomcellen. Om het transgen in de T-cellen tot expressie te brengen, worden deze getransduceerd met een lentivirale vector.

De replicatie-deficiënte zelf-inactiverende (SIN) lentivirale vector die gebruikt wordt, wordt vervaardigd met een 3^e generatie lentiviraal productiesysteem. Hiervoor worden 'human embryonic kidney' (HEK) 293T cellen getransfecteerd met een transfervector die het gewenste transgen bevat, twee packagingplasmiden die Gag, Pol en Rev tot expressie brengen, en met een pseudotyperend plasmide dat het oppervlakte-eiwit G van *Vesiculovirus indiana* (VSIV-G) tot expressie brengt. De transfervector wordt geflankeerd door de virale 5'- en 3'-LTR sequenties en bevat het packaging signaal Ψ , zodat het transgen in de vectordeeltjes wordt ingepakt. De expressie van de CAR wordt gereguleerd door een hybride EF1 α (alpha)/HTLV-1R promotor, die bestaat uit de kern van de EF1 α -promotor en het R-element van de LTR-sequentie van HTLV-1.

Bij dit productiesysteem wordt tevens gebruik gemaakt van een extra (5^e) plasmide, dat codeert voor een gemodificeerd U₁ pre-snrRNA ('small nuclear RNA'). snRNA's zijn kleine RNA-moleculen die helpen bij het verwerken van het pre-mRNA in de celkern. Door toevoeging van deze plasmide kan de lentivirale titer verhoogd worden.

4. Overweging

De COGEM heeft randvoorwaarden gedefinieerd bij de generieke milieurisicobeoordeling 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^e generatie SIN-lentivirale deeltjes. De lentivirale vectoren die in onderhavige studie gebruikt worden, zijn geproduceerd met een productiesysteem waarbij gebruik gemaakt is van een extra plasmide. 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 geverifieerd is door middel van sequensen (Next Generation Sequencing, NGS) en identiek is bevonden aan de beoogde sequenties. Daarnaast is de identiteit van de transferplasmide en de helperplasmiden bevestigd met behulp van Sanger-sequensen, en identiek bevonden aan de referentiesequenties.

De COGEM is van oordeel dat de aanvrager de moleculaire karakterisering voldoende heeft uitgevoerd en voldoet aan de eisen die zij hiervoor heeft gesteld.¹⁻⁹

4.2 Replicatie-competent lentivirus bij de productie van de lentivirale vectoren

Een mogelijk risico bij de productie van lentivirale vectordeeltjes is het ontstaan van replicatie-competent lentivirus (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 vastgesteld dat in de wetenschappelijke literatuur nooit meldingen zijn geweest van de aanwezigheid van RCL bij gebruik van een 3^e generatie SIN productiesysteem.^{10,11,12} In het verleden heeft de COGEM gesteld dat vorming van RCL tijdens de productie van 3^e generatie SIN lentivirale vectoren niet mogelijk is,¹³ en een RCL test daarom niet noodzakelijk is.¹

In de onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van een 3^e generatie productiesysteem waaraan een extra plasmide is toegevoegd dat een gemodificeerd U1 pre-snRNA tot expressie brengt om de lentivirale titer te verhogen. De aanvrager heeft in een vertrouwelijke bijlage gegevens aangeleverd over deze plasmide, bestaande uit een vectorkaartje en een beschrijving van de elementen aanwezig op het plasmide. Er zijn geen (lenti- of retro-)virale elementen aanwezig op het U1 pre-snRNA plasmide die de kans op RCL vorming zouden kunnen verhogen. De kans op aanwezigheid van RCL afkomstig uit het productiesysteem in het medisch product, acht zij verwaarloosbaar klein.

Daarnaast worden standaard RCL-testen uitgevoerd op de 'packaging' cellijnen ('end of production cells, EOPC's) en het uiteindelijke vector product (VP). Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een 'co-culture assay' in C8166-detectorcellen, gevolgd door een 'product enhanced reverse transcriptase' (PERT) qPCR-assay. Er is geen RCL ontdekt tijdens productie van de vector. Tevens zijn de eerste 40 'clinical lots' van het eindproduct BMS-986393 getest op RCL en negatief bevonden.

De expressie van de CAR wordt gereguleerd door een hybride promotor die volgens de aanvrager bestaat uit de kern van de EF1 α -promotor en het R-element van de LTR-sequentie van HTLV-1. De COGEM kan op basis van de aangeleverde informatie niet geheel uitsluiten dat het HTLV-1 fragment ook een klein deel van de U5 bevat, zoals in eerdere publicaties over deze promotor beschreven is.^{0.a.14,15} Over de aanwezigheid van een korte HTLV-1 promotorsequentie (oftewel een partiële LTR-sequentie waaruit het U3-domein en een deel van het U5-domein zijn verwijderd) in de lentivirale transfervector en in het medisch product, heeft de COGEM echter eerder geadviseerd dat hiervan de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.^{4,16}

4.3 Aanwezigheid van vrije lentivirale vectordeeltjes in het eindproduct

Volgens de aanvrager is het aantal vrije vectordeeltjes in het eindproduct verwaarloosbaar klein door de gehanteerde processen tijdens de productie, en de natuurlijke degradatie van de vector. De aanvrager gaat hierbij uit van een halfwaardetijd van 10,4 uur van de VSV-G gepseudotyperde lentivirale vector en 5 dagen kweektijd na transductie. De aanvrager geeft een theoretische benadering van het aantal vectordeeltjes, berekend met een eigen formule. De aanvrager stelt dat er een clearance van 8.68 logs bereikt wordt. Ook wordt vermeld dat bij een ander CAR-T product, waarbij een vergelijkbaar productieproces werd gehanteerd, geen infectieuze lentivirale vectoren zijn gedetecteerd. Er wordt echter niet beschreven op welke manier dit is onderzocht.

De aanvrager heeft in een vertrouwelijke bijlage tevens de COGEM-formule gebruikt om de reductieratio te berekenen. Volgens de aanvrager wordt een substantiële reductie van het aantal vrije vectordeeltjes behaald, en wordt een reductieratio van >1 bereikt (overeenkomstig met <1 vrije vectordeeltjes). De COGEM merkt echter op dat verschillende waarden die de aanvrager in de formule gebruikt, incorrect of onduidelijk zijn:

- De halfwaardetijd die de aanvrager hanteert (10,4 uur) is incorrect en berust op verouderde gegevens. De COGEM heeft in 2020 de halfwaardetijd van lentivirale vectoren gepseudotyperd met verschillende envelop-eiwitten experimenteel laten bepalen, en voor VSV-G gepseudotyperde lentivirale vectoren bleek de halfwaardetijd 34,7 uur (dat overeenkomt met een F-waarde van 0,7);¹⁷
- De waarde van het startinoculum (C_i) wordt enkel genoemd in de vertrouwelijke bijlage. Op basis van de aangeleverde informatie om het startinoculum te berekenen, zou deze een factor 100 hoger uitkomen;
- Tijdens het productieproces wordt gebruik gemaakt van een systeem waarbij het medium waarin de cellen zich bevinden automatisch gedeeltelijk wordt verwijderd en aangevuld. In plaats van een vast aantal wasstappen te definiëren, hanteert de aanvrager een clearance van 8,68 logs. De COGEM merkt op dat de berekening van de 8,68 log clearance die door de aanvrager is gedaan, slecht tot niet navolgbaar is.

Op basis van de aangeleverde informatie van de aanvrager die een aantal onduidelijkheden en fouten bevat, kan de COGEM niet tot een herberekening komen van de reductieratio en is het niet mogelijk om vast te stellen of er infectieuze vectordeeltjes aanwezig zullen zijn in het eindproduct. De COGEM adviseert derhalve de generieke maatregelen te hanteren die zijn opgesteld wanneer de aanwezigheid

van vrije lentivirale vectordeeltjes niet uitgesloten kan worden,^{2,18} tenzij uit een navolgbare nacalculatie volgt dat er geen vrije vectordeeltjes aanwezig zijn in het medische product.

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.^{1,5} Van klinische studies die aan de hierin genoemde voorwaarden voldoen, is het milieurisico verwaarloosbaar klein. De huidige vergunningaanvraag wijkt af van de gestelde randvoorwaarden, omdat bij de productie van de vector gebruikt is gemaakt van een 3^e generatie productiesysteem waaraan een extra plasmide is toegevoegd. De COGEM is van oordeel dat het toevoegen van het U₁ pre-snRNA plasmide tijdens de productie van de vector geen verhoogd risico op RCL geeft. Zij acht de kans verwaarloosbaar klein dat er RCL in het toe te dienen product aanwezig is.

Op basis van de aangeleverde informatie kan niet uitgesloten worden dat er nog vrije vectordeeltjes aanwezig zijn in het medische product. De COGEM adviseert derhalve de geadviseerde generieke maatregelen in acht te nemen om te voorkomen dat derden aan vrije vectordeeltjes worden blootgesteld, of een navolgbare berekening aan te leveren waaruit blijkt dat het aantal vrije vectordeeltjes verwaarloosbaar klein is.

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 wanneer aan enkele generieke maatregelen wordt voldaan om potentiële blootstelling van derden aan vrije vectordeeltjes te voorkomen, of wanneer uit een navolgbare berekening volgt dat er geen vrije vectordeeltjes aanwezig zijn in het medische product.

Referenties

1. COGEM (2019). Generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met *ex vivo* retro- en lentiviraal getransduceerde cellen. COGEM-advies CGM/190729-01
2. 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
3. COGEM (2024). Generiek advies over elementen in lenti- en retrovirale vectoren. COGEM-advies CGM/240612-01
4. COGEM (2025). Advies virale promotorsequenties in lenti- en retrovirale vectoren. COGEM-advies CGM/250122-01
5. 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
6. COGEM (2019). Immunotherapie met genetisch gemodificeerde T-cellen: onbedoelde blootstelling en potentiële risico's. COGEM-signalering CGM/190227-01
7. COGEM (2020). Beoordeling van risico's voor derden bij genterapiestudies met replicatie-deficiënte ggo's en gg-T-cellen. COGEM-advies CGM/2000123-01
8. Minister van Infrastructuur en Waterstaat (2020). Beleidsnota Biotechnologie 27428, nr. 366. <https://zoek.officielebekendmakingen.nl/kst-27428-366.html> (bezoekt op 4 maart 2025)
9. COGEM (2013). Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing. COGEM-advies CGM/130227-05
10. 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

11. 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
12. Cornetta K *et al.* (2018). Absence of replication competent lentivirus in the clinic: analysis of infused T cell products. *Mol. Ther.* 26: 280-288
13. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. COGEM advies CGM/090331-03
14. Fauquenoy S *et al.* (2017). Repression of Human T-lymphotropic virus type 1 Long Terminal Repeat sense transcription by Sp1 recruitment to novel Sp1 binding sites. *Sci. Rep.* 7: 43221
15. InvivoGen. pNiFty3-N-SEAP. A NF- κ B-inducible reporter plasmid selectable with Zeocin. https://www.invivogen.com/sites/default/files/invivogen/products/files/pnifty3_n_seap_tds.pdf (bezocht op 25 februari 2025)
16. COGEM (2024). Klinische studie met allogene en autologe ex vivo lentiviraal getransduceerde CAR T-cellen. COGEM-advies CGM/241021-01
17. 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
18. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. Bijlage 10, Deel D, Artikel D:5. Voorkomen van vermenging en verspreiding. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2025-01-01#Bijlage10> (bezocht: 10 maart 2025)