

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

DATUM 05 augustus 2019
KENMERK CGM/190805-01
ONDERWERP Advies Klinische studie gg-CD34+ cellen tegen SCID

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,


Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 18-014_000 getiteld: 'RAG1-SCID and RAG2-SCID CD34+ gene therapy using 3rd generation self-inactivating (SIN)-lentiviral vector' van het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC), 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-)stamcellen (CD34+) in jonge patiënten met een ernstige immuunstoornis (SCID). In deze patiënten veroorzaakt een genetisch defect in het *RAG1* of *RAG2* gen een onderontwikkeld immuunsysteem. De patiënten worden behandeld met lichaamseigen CD34+ cellen die door genetische modificatie een goedwerkende variant van het *RAG1* of *RAG2* gen tot expressie brengen.

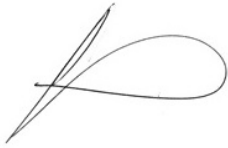
Mogelijke risico's die bij een dergelijke klinische studie kunnen optreden, hebben vooral betrekking op de eventuele vorming en verspreiding van replicatiecompetent lentivirus (RCL) en de aanwezigheid van vrije virale vectordeeltjes in het medisch product.

De kans op de aanwezigheid van RCL of recombinant virus in het eindproduct acht de COGEM verwaarloosbaar klein. Door beperkingen in de uitgevoerde kweek- en wasprocedures tijdens de productie van de gg-CD34+ cellen zal het eindproduct nog infectieuze vectordeeltjes bevatten. De COGEM acht het risico van de aanwezigheid van vrije infectieuze vectordeeltjes in het medische product echter verwaarloosbaar klein gezien het gebruikte vectorsysteem en het onschadelijke karakter van het transgen. De COGEM is daarom van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan 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. Dr. J. Westra, Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW
 Dr. B.M. te Riet-Schulte, Loket Gentherapie

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 met lentiviraal getransduceerde CD34+ cellen ter behandeling van RAG-1-SCID en RAG-2-SCID

COGEM advies CGM/190805-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd om te adviseren over een aanvraag (IM-MV 18-014) voor een fase I/II klinische studie waarbij genetisch gemodificeerde (gg-)hematopoëtische stamcellen (CD34+) worden toegediend aan patiënten met een specifieke vorm van ‘severe combined immunodeficiency’ (SCID), door een genetisch defect in het ‘Recombinase Activating Gene 1’ (*RAG1*) of ‘Recombinase Activating Gene 2’ (*RAG2*) gen. Door patiëntspecifieke, lichaamseigen CD34+ cellen *ex vivo* te transduceren met een replicatie-deficiënte lentivirale zelf-inactiverende (SIN) vector worden de CD34+ cellen voorzien van goedwerkende RAG1 of RAG2 eiwitten. Het eindproduct, de gg-CD34+ cellen (RAG1 of RAG2 celproduct), wordt vervolgens teruggeplaatst in de patiënt om de ziekte te behandelen. Het doel van de klinische studie is om de veiligheid en de mogelijke werkzaamheid van het RAG1 of RAG2 celproduct te onderzoeken voor pediatrische patiënten met RAG1-SCID, RAG2-SCID of andere vormen van SCID die gerelateerd zijn aan RAG deficiëntie (bijvoorbeeld het syndroom van Omenn). De werkzaamheden voor deze studie zullen worden uitgevoerd in het LUMC.

1.1 Achtergrondinformatie

De afgelopen jaren zijn er verschillende vergunningaanvragen beoordeeld voor klinische studies waarbij retro- of lentiviraal getransduceerde gg-T-cellen ingezet worden als immunotherapie tegen (voornamelijk) B-cel maligniteiten.^{o.a. 1,2,3,4,5,6,7,8} Bij patiënten met RAG1-SCID of RAG2-SCID is de ontwikkeling van B- of T-cellen vanuit CD34+ cellen verstoord, waardoor de patiënten vatbaar zijn voor infecties door bijvoorbeeld bacteriën, schimmels, of virussen. Het therapeutische doelwit in de huidige vergunning aanvraag, de *RAG1* en *RAG2* genen, spelen een belangrijke rol bij de ontwikkeling van B- of T-cellen vanuit de hematopoëtische stamcellen. De RAG1 en RAG2 eiwitten zijn endonucleases die betrokken zijn bij de herschikking van immunoglobuline en T-cel receptor genen.^{9,10} Het RAG1 en RAG2 eiwit zijn respectievelijk 1043 en 527 aminozuren groot en tezamen vormen zij een heterodimeer die dubbelstrengsbreuken op specifieke plaatsen in het DNA kan aanbrengen.¹¹ Door de stochastische herschikking van de hierdoor ontstane gensegmenten ontstaat variatie in de receptoren van B- en T-cellen, wat nodig is voor een gezonde immuunfunctie. Door nonsense mutaties in de *RAG1* of *RAG2* genen kan er geen antigeen receptor herschikking plaatsvinden, waardoor differentiatie naar B- of T-cellen geblokkeerd wordt en er sprake is van het ziektebeeld SCID.

Patiënten met SCID krijgen al in de eerste maanden van hun leven symptomen, zoals longontsteking, diarree, opportunistische infecties en onvoldoende gewichtstoename. Wanneer de ziekte niet wordt behandeld is deze dodelijk, en overlijden de meeste kinderen in het eerste levensjaar aan ernstige infecties.¹² De reguliere behandeling van RAG1-SCID of RAG2-SCID betreft een hematopoëtische stamceltransplantatie. In deze fase I/II klinische studie worden CD34+ cellen

voorzien van een goedwerkend *RAG1* of *RAG2* gen, waardoor verwacht wordt dat de blokkade tot B- of T-cel differentiatie opgeheven wordt en de immuunfunctie hersteld wordt.

In de onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van een zelf-inactiverende (SIN) lentivirale vector, afgeleid van het *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1) om CD34+ cellen te transduceren. Het genoom van HIV-1 heeft aan weerszijden een Long Terminal Repeat (LTR). Daarnaast bevat het genoom een 'packaging' signaal (ψ), drie structurele genen (*gag*, *pol* en *env*), vier accessoire genen (*vif*, *vpr*, *vpu* en *nef*) en twee regulatoire genen (*tat* en *rev*).¹³

Van nature infecteert HIV-1 de verschillende cellen van het immuunsysteem zoals T-lymfocyten, macrofagen en monocytten. Voor een bredere toepasbaarheid van lentivirale vectoren wordt het gastheerbereik meestal uitgebreid door pseudotypering van de lentivirale deeltjes met een oppervlakte eiwit (glycoproteïne) van Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV) (species: *Indiana vesiculovirus*, voorheen Vesicular stomatitis virus (VSV)). Ook in de onderhavige aanvraag is het VSIV glycoproteïne (VSIV-G, voorheen VSV-G) gebruikt voor een efficiënte transductie van de CD34+ cellen.

1.2 Productie van de replicatie-deficiente lentivirale SIN vector

De lentivirale vectoren die gebruikt wordt voor de transductie van de autologe CD34+ cellen, worden geproduceerd met een productiesysteem van de derde generatie. Er worden twee verschillende vectoren geproduceerd voor de transductie van CD34+ cellen, waarbij de ene vector het *RAG1* gen bevat, en de andere vector het *RAG2* gen. Het productiesysteem van beide vectoren is identiek, alleen het insert in de vectoren verschilt. Uiteindelijk worden hiermee twee verschillende celproducten verkregen, namelijk het RAG1 celproduct (voor patiënten met RAG1-SCID) en het RAG2 celproduct (voor patiënten met RAG2-SCID).

Tijdens de productie van de lentivirale vector worden de verschillende virusgenen opgesplitst en verdeeld over vier verschillende plasmiden. Deze plasmiden worden gezamenlijk in HEK293T cellen (humane embryonale niercellen) getransfecteerd om vectordeeltjes te produceren.^{13,14} Door deze opsplitsing wordt de kans op het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus (RCL) tijdens de productie van lentivirale vectoren gereduceerd. Ook is bij de vector in de huidige aanvraag een deel van de 3'LTR verwijderd (SIN vector),^{15,16} waardoor de kans op mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheer aanzienlijk gereduceerd wordt. Verder is de originele 5' LTR vervangen door een chimere niet-intacte 5' LTR, met een enhancer en promoter van human cytomegalovirus (CMV) in plaats van de U3 regio van de 5'LTR. Omdat bij integratie van het transgen in de CD34+ cellen het 3'SIN construct gedupliceerd word (en daarmee de 5'LTR vervangen wordt), zal de CMV promoter niet integreren in het celproduct.

De transferplasmiden (pCCL-MND-coRAG1 en pCCL-PGK-coRAG2) coderen voor het genoom van de bovenbeschreven lentivirale vectoren en bevatten beide onder meer een 'human CMVp-R-U5' regio, een 3'LTR-SIN, het 'packaging' (ψ) signaal, een deel van het *gag* gen, het 'Rev Response element' (RRE), een gemodificeerd '(central) polypurine tract/central termination sequence' (cPPT/CTS), een gemodificeerd 'Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element'

(WPRE) fragment en de transgene (*RAG1* of *RAG2*) sequentie. De PPT overlapt met het virale *Nef* gen, waardoor 59 nucleotiden van het *Nef* gen aanwezig zijn in het vectorgenoom. De *RAG1* en *RAG2* genen zijn codon geoptimaliseerd. Het *RAG1* transgen in pCCL-MND-coRAG1 staat onder de controle van een ‘myeloproliferative sarcoma virus enhancer, negative control region deleted, dl587rev primer-binding site substituted (MND) promoter’. Het *RAG2* transgen in pCCL-PGK-coRAG2 staat onder de controle van een ‘human phosphoglycerate kinase (PGK)-1 promoter’.

Twee helperplasmiden bevatten de coderende sequentie voor HIV componenten die essentieel zijn voor virusproductie. Dit zijn respectievelijk de eiwitten Gag, Pol en Rev waarbij de coderende sequentie voor Gag en Pol gezamenlijk op één plasmide ligt. De laatste plasmide codeert voor het glycoproteïne afkomstig van VSIV. De niet-essentiële accessoire en regulatoire HIV-1 genen zijn uit het vectorsysteem verwijderd. Na co-transfectie van HEK293T cellen met de transferplasmide en de drie helperplasmiden wordt een VSIV-G gepseudotyperde lentivirale SIN vector geproduceerd waarmee de autologe CD34+-cellen worden getransduceerd.

1.3 Productie van *RAG1* en *RAG2* cellen

Voor de productie van de gg-CD34+ cellen (*RAG1* of *RAG2* celproduct) worden CD34+ cellen uit het beenmerg (of uit perifere bloed) van de patiënt geïsoleerd, en *ex vivo* getransduceerd met de replicatie-deficiënte lentivirale SIN vector. Het beenmerg (of bloed) kan ook lage percentages van monocyten, macrofagen of dendritische cellen bevatten, maar in het algemeen bevat het *RAG1* of *RAG2* celproduct meer dan 90% CD34+ cellen. Na integratie van het *RAG1* of *RAG2* gen in het genoom van de gg-CD34+ cellen worden de cellen vermeerderd en gecryopreserveerd. De productie van de lentivirale vector (onder ingeperkt gebruik) vindt plaats in Nederland onder verantwoordelijkheid van derden. Productie van de gg-CD34+ cellen vindt plaats in het LUMC onder ingeperkt gebruik en valt niet onder deze vergunningaanvraag. De gg-CD34+ cellen worden via infusie teruggebracht in de patiënt, waar zij zich opnieuw zullen vestigen in het beenmerg.

2. Voorgenomen werkzaamheden

Het *RAG1* of *RAG2* celproduct wordt via intraveneuze infusie toegediend via een centraal veneuze katheter aan maximaal 200 pediatrische patiënten (tot 10 kg) met *RAG1*-SCID, *RAG2*-SCID of andere vormen van SCID die gerelateerd zijn aan RAG deficiëntie. Er worden maximaal 25×10^6 cellen per kilogram toegediend aan de patiënten.

Getraind medisch personeel zal de standaard geldende procedures volgen voor infusie van hematopoëtische stamcellen. Het personeel draagt een beschermende jas en dubbele handschoenen tijdens de toediening. Op verschillende momenten na infusie zullen monsters (onder meer bloed, beenmerg en biopten van lymfeknopen) afgenomen worden. Deze monsters worden getest op aanwezigheid van *RAG1* of *RAG2* cellen met behulp van qPCR (detectie van WPRE/coRAG1 of 2) en ‘flow’ cytometrie (detectie van B- of T-cellen of TCR/Ig), maar niet getest op aanwezigheid van vrije vectordeeltjes of RCL. Bij deelname aan deze klinische studie worden de patiënten door de aanvrager afgeraden om na toediening van de gg-CD34+ cellen, bloed, bloedproducten, organen, weefsels en cellen voor (hematopoëtische stamcel)transplantatie te doneren. Ook zullen de patiënten

een codicil bij zich dragen met informatie over het ggo. Verder worden patiënten met HIV-1 of -2 en HTLV-1 of -2 infecties uitgesloten van deelname aan de studie.

3. Overweging

In de onderhavige aanvraag worden gg-CD34+ cellen (RAG1 of RAG2 celproduct) toegediend aan pediatrische patiënten (tot 10 kg) met RAG1-SCID, RAG2-SCID of andere vormen van SCID die gerelateerd zijn aan RAG deficiëntie. Mogelijke risico's die hierbij kunnen optreden, hebben betrekking op (1) de eventuele vorming van RCL of recombinant virus, (2) de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes en (3) de effecten van mogelijke verspreiding van de gg-CD34+ cellen in het milieu. Door deze verspreiding zouden andere personen dan de deelnemende patiënten gecontamineerd kunnen raken met de gg-CD34+ cellen of geïnfecteerd kunnen worden met een recombinant virus. Om eventuele milieurisico's die hieruit voortvloeien te kunnen beoordelen, is een karakterisering van de gg-CD34+ cellen van belang.

3.1 Moleculaire karakterisering

De COGEM heeft in 2013 criteria voor de moleculaire karakterisering van ggo's voor medische toepassingen vastgesteld. Hierin staat vermeld dat het insert in het ggo volledig gesequenced dient te worden. De sequentieanalyse dient het insert met eventueel gebruikte recombinatiesequenties te omvatten en dient aan weerszijden van het insert enkele tientallen nucleotiden door te lopen in het genoom van het acceptororganisme.¹⁷

Voor de productie van het medisch product worden van iedere patiënt de lichaamseigen CD34+-cellen gebruikt. Hierdoor is het medische product voor iedere patiënt uniek. Aangezien de integratie-sites van de lentivirale vector in het gastheergenoom tot op zekere hoogte willekeurig zijn, zorgt dit binnen het medische product voor verschillen tussen de getransduceerde cellen onderling. Ook kan de COGEM niet geheel uitsluiten dat er tijdens het productieproces van het medische product enkele puntmutaties in het in de CD34+ cellen geïntegreerde virale vectorgenoom ontstaan. De aanvrager heeft de twee transferplasmiden pCCL-MND-coRAG1 en pCCL-PGK-coRAG2 en de drie helperplasmiden volledig gesequenced en geeft aan dat plasmide batches alleen worden vrijgegeven als de sequentie van het insert 100% identiek is aan de referentiesequentie. De aanvrager voert ook een qPCR uit om de identiteit van de coRAG1 en coRAG2 transgene sequenties in getransduceerde beenmergcellen van muizen te controleren. Daarnaast wordt een kleine fractie van het RAG1 of RAG2 celproduct geanalyseerd op aanwezigheid van de *RAG1* of *RAG2* transgenen met behulp van q-PCR.

De sequentie van het insert wordt niet in elk eindproduct (de gg-CD34+ cellen) gecontroleerd. Met het oog op de genoemde verschillen tussen de getransduceerde cellen acht de COGEM een exacte moleculaire karakterisering van de gg-CD34+ cellen praktisch gezien niet haalbaar. De COGEM is van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat deze beperking in de moleculaire karakterisering van de gg-CD34+ cellen tot een misrekening kan leiden in de milieurisicobeoordeling.

De COGEM is van oordeel dat de aanvrager de moleculaire karakterisering afdoende heeft uitgevoerd.

3.2 De kans op vorming van RCL of recombinant virus

Een mogelijk risico bij de productie van lentivirale vectordeeltjes is het ontstaan van RCL. In theorie zou RCL kunnen ontstaan door recombinatie tussen de verschillende plasmiden benodigd voor de productie van de virale vector, of met endogene retrovirussequenties die in het genoom van de gebruikte cellijn aanwezig zijn.

Vorming van RCL tijdens de productie van de virale vector

De kans op het ontstaan van RCL tijdens de productie van de virale vector is afhankelijk van het aantal recombinatie 'events' dat nodig is om een replicatiecompetent vectordeeltje te construeren. Tijdens de productie van lentivirale SIN vectoren met het productiesysteem van de derde generatie moeten minimaal drie recombinatie gebeurtenissen plaatsvinden, moeten de ontbrekende accessoire genen worden opgenomen in het genoom van de vector en dient de LTR van het SIN-construct gerepareerd te worden, alvorens RCL zou kunnen ontstaan. In de wetenschappelijke literatuur zijn nooit meldingen geweest van RCL bij gebruik van een derde generatie productiesysteem.^{18,19}

In onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van een SIN lentiviraal productiesysteem van de derde generatie. Hierin zijn de sequenties die nodig zijn voor productie van de lentivirale vector verdeeld over vier verschillende plasmiden. In de onderhavige aanvraag zijn de niet essentiële HIV-1 genen *vif*, *vpr*, *vpu* en *nef*, het essentiële regulatoire gen *tat*, en het structurele HIV-1 gen *env* uit het systeem verwijderd. Ook is de gag/pol plasmide aangepast zodat dezelfde aminozuren geproduceerd worden, maar met een andere nucleotidesequentie om sequentieovereenkomst met wildtype HIV te minimaliseren. De COGEM acht de kans op RCL-vorming bij een SIN vector van de derde generatie verwaarloosbaar klein.²⁹

De aanvrager stelt dat gedurende de productie van het celproduct (in de 'end-of-vector-production' (EOP) cellen) en bij het vrijgeven van de lentivirale vector (de 'bulk harvest') getest wordt op RCL met behulp van een 'cell-based RCL assay'. Voor de 'bulk harvest' wordt afwezigheid van RCL bepaald met behulp van een C8166 humane T-cel lijn waarin de vector 6 keer wordt gepasseerd. Voor de EOP cellen wordt een co-cultuur van EOP cellen en de C8166 cellen gebruikt. Bij elke passage (in de EOP test en de 'bulk harvest') werden monsters afgenomen en getest met een p24 ELISA om virus replicatie te detecteren. Ook zijn bij elke passage cellulaire en vector-specifieke DNA sequenties gekwantificeerd met RT-qPCR, namelijk (SV40 T-antigen (i.e., Ag, specifiek voor de 293T cellen, positieve controle) en GagWt (HIV-specifiek) voor de EOP cellen, en dGAG (transfervector-specifiek), hAlb (humaan albumine gen), gagWt (HIV-1 gag gen), VSV (VSV-G envelop), E1A (gen uit de 293T cellen) en SV40 T Ag voor de 'bulk harvest' passages. De aanvrager geeft aan dat de detectielimiet van de RT-qPCR test <6 kopieën is. De RCL test dient negatief te zijn alvorens het gg-CD34+ cel product geproduceerd kan worden.

De aanvrager geeft aan dat het medisch eindproduct (de RAG1 en RAG2 gg-CD34+ cellen) niet wordt getest op RCL, omdat afwezigheid van RCL al is bevestigd voorafgaand aan vrijgave van de vectorbatch met een gevoelige en gevalideerde assay. De aanvrager geeft verder aan dat er nog nooit RCL gerapporteerd is bij klinische toepassingen met lentivirale vectoren.^{20,21,22}

Alle punten in overweging nemende acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de vectorbatch, waarmee het medische product wordt gevormd, RCL zal bevatten.

Recombinatie of complementatie van de vector in het medisch product

In theorie zou recombinatie met of complementatie van de virale vector ook kunnen plaatsvinden in de getransduceerde CD34+ cellen met mogelijk het ontstaan van RCL of recombinant virus tot gevolg. Een eerste vereiste hiervoor is de aanwezigheid van een verwant lenti- of retrovirus in dezelfde cel als de lentivirale vector, die de verloren functies van de vector kan complementeren. De aanvrager heeft als exclusiecriteria gehanteerd dat patiënten met retrovirale infecties (HIV-1, en -2, en HTLV-1, en -2) uitgesloten worden van deelname. Hierbij wordt aangetekend dat patiënten na de behandeling niet actief gescreend worden op HIV of HTLV infectie. De COGEM heeft eerder geconcludeerd dat het niet uitsluiten van patiënten met HTLV infectie geen invloed heeft op de milieurisicobeoordeling.^{2,8} Het SIN construct in (lentivirale) vectoren verkleint de kans op mobilisatie door HIV superinfectie sterk, maar kan mobilisatie niet geheel voorkomen.^{23,24} De kans op mobilisatie kan verder gereduceerd worden door anti-retrovirale middelen (geïndiceerd bij HIV infectie), die de 'viral load' verlagen, waarmee ook de kans op transductie door een eventueel gemobiliseerde vector afneemt. Nadelige effecten ten gevolge van eventuele mobilisatie worden niet verwacht, omdat de vector een lichaamseigen gen (*RAG1* of *RAG2*) bij zich draagt. Recombinatie met wildtype HIV kan theoretisch resulteren in een replicatiecompetent lentivirus waarin het *RAG1* of *RAG2* gen tot expressie komt. Er is echter geen reden om aan te nemen dat expressie van de *RAG* genen de pathogeniteit of fitness van het virus zal verhogen, maar zeer waarschijnlijk zal dit eerder bijdragen aan attenuatie. In muizenstudies is aangetoond dat overexpressie van alleen *RAG1* of *RAG2* niet leidt tot leukemie of andere maligniteiten.^{9,25} Alles in ogenschouw nemende acht de COGEM de kans op mobilisatie, complementatie en recombinatie in de onderhavige studie verwaarloosbaar klein bij een eventuele HIV infectie bij de behandelde patiënt op latere leeftijd. Overigens merkt de COGEM op dat een potentieel recombinant virus minder risico geeft dan de aanwezigheid van wildtype HIV.

Tot slot merkt de COGEM op dat ca. 8% van het humane genoom uit endogene retrovirale sequenties bestaat.²⁶ Deze worden voornamelijk gerelateerd aan beta-retrovirussen en in een enkel geval aan gamma-retrovirussen. Door accumulatie van vele inactiverende mutaties coderen deze sequenties niet voor replicatiecompetente Human endogenous retroviruses (HERVs).^{26,27,28} Daarbij merkt de COGEM op dat het aandeel van HIV sequenties in het genoom van de virale vector tot een minimum is beperkt, wat de kans op homologe recombinatie tussen de endogene retrovirussequenties en de virale vector minimaliseert.

Op grond van bovenstaande acht de COGEM de kans op de aanwezigheid van recombinant virus door recombinatie of complementatie in de getransduceerde CD34+ cellen verwaarloosbaar klein.

3.3 Aanwezigheid van vrije vectordeeltjes

Na transductie van de gg-CD34+-cellen kunnen vrije vectordeeltjes in het te testen medisch product achterblijven. In het geval van calamiteiten zouden deze vrije vectordeeltjes naar derden kunnen

verspreiden, zoals bij een prikincident waardoor de behandelend arts of het verplegend personeel hiermee besmet kan raken. Door de kweek- en wasprocedures die worden gevolgd, voordat het uiteindelijke medisch product wordt verkregen, kan het aantal vrije vectordeeltjes worden gereduceerd. De COGEM heeft in 2009 een formule opgesteld om de reductie van de vectordeeltjes als gevolg van de kweek- en wasprocedures te kunnen berekenen.²⁹ In een advies uit 2018 heeft de COGEM de risico's van vrije vectordeeltjes voor mens en milieu heroverwogen en de veiligheidsmarge van de reductieratio onder bepaalde voorwaarden (VSV-G gepseudotypeerde lentivirale vectoren en bij een goedwerkend complementsysteem) op 1 gesteld (i.e., maximaal 1 vectordeeltje per toe te dienen batch gg-cellen).³⁰ De aanvrager heeft aangegeven dat er maximaal 250×10^6 vectordeeltjes gebruikt worden voor transductie. Er worden 3 wasstappen uitgevoerd, en 1 dag gekweekt. Wanneer deze gegevens toegepast worden in de formule, wordt er een virusreductieratio van 0,00017 gerealiseerd (dat overeenkomt met ongeveer 5921 vectordeeltjes per toe te dienen batch gg-CD34+ cellen).

De aanvrager geeft hierbij aan dat de transductie-efficiëntie niet is meegenomen in de formule, en dat als 'acceptance' criteria een 'vector copy number' (VCN) van $\geq 0,2$ gehanteerd wordt. Dat wil zeggen dat 20% van de vectordeeltjes de cellen transduceren en buiten de berekening gelaten kunnen worden. Hiermee stelt de aanvrager het uiteindelijke aantal vectordeeltjes in het inoculum bij op 200×10^6 , resulterend in een reductieratio van 0,00021 (i.e., circa 4737 aanwezige virusdeeltjes).

De aanvrager geeft ook aan dat na toediening van het medische product inactivatie van vectordeeltjes plaatsvindt door aanwezigheid van complementeiwitten in het bloed van de patiënt. Deze complementeiwitten zijn onderdeel van het humoraal immuunsysteem, en zijn in staat om lentivirusdeeltjes met VSV-G envelopeiwit te inactiveren.³¹ Ook zal, gegeven de halfwaardetijd van VSV-G gepseudotypeerde lentivirale vectoren³², 24 uur na toediening 90% van de vrije vectordeeltjes niet meer aanwezig zijn.

De COGEM is van oordeel dat de door haar opgestelde formule om het aantal vrije vectordeeltjes in te schatten op correcte wijze door de aanvrager is toegepast. De berekende virusreductieratio ligt onder het door de COGEM gestelde minimum van 1. Derhalve acht de COGEM het zeer waarschijnlijk dat er infectieuze vrije virusdeeltjes in het medische product aanwezig zullen zijn.

3.4 Effecten van blootstelling aan vrije vectordeeltjes en insertionele mutagenese

De aanwezigheid van replicatiedeficiënte vrije vectordeeltjes wordt, vanwege de kans op het optreden van insertionele mutagenese, als risicofactor gezien.³³ Het risico van insertionele mutagenese is echter voornamelijk een risico voor de patiënt en met name gebaseerd op gegevens van experimenten en klinische studies met uit muizen afkomstige gamma-retrovirale vectoren. Bij gebruik van lentivirale vectoren in plaats van retrovirale vectoren neemt de kans op integratie nabij 'transcription start sites' af.³⁴

De aanvrager stelt dat lentivirale vectoren die gebruikt worden voor klinische studies ('GMP-grade') *in vivo* geen secundaire targets transduceren (zoals antigeenpresenterende cellen of kiembaancellen) en verwijst hierbij naar de literatuur.³⁵ In het theoretische geval dat transductie van secundaire cellen plaatsvindt door de vrije lentivirale vectordeeltjes, hoeft dit niet altijd gepaard te

gaan met negatieve effecten. Zo gebeurt insertie van het transgen vrijwel altijd op een enkel allel, heeft een verkeerde insertie vaak een negatieve invloed op de overleving van de cel, en is een enkele mutatie die ontstaat door insertie volgens de huidige staat van kennis niet voldoende om een maligniteit te ontwikkelen.^{36,37} Bovendien zijn de (SIN) lentivirale vectoren replicatiedeficiënt, waardoor ze maar één keer kunnen integreren en zich niet verder kunnen verspreiden. Ook stelt de aanvrager dat de kans op het ontstaan van dubbelstrengs DNA breuken door ectopische expressie van het *RAG1* of *RAG2* gen verwaarloosbaar klein is, omdat de RAG eiwitten afhankelijk zijn van elkaar (en er maar één van de twee transgenen geïnsereerd wordt). Verder is de activiteit van *RAG1* en *RAG2* beperkt tot B- en T-cellen in de fase van differentiatie en heeft geen invloed op (on)volwassen lymfocyten.^{38,39}

Blootstelling van derden aan vrije vectordeeltjes kan plaatsvinden bij bloedcontact door bijvoorbeeld prikincidenten (zoals bij toediening van het medische product, of bij monsterafname). Bij prikincidenten tijdens monsterafname zullen echter beduidend minder vrije vectordeeltjes overgedragen worden dan aanwezig zijn in het medische product. Vrije vectordeeltjes zouden ook uitgescheiden kunnen worden door de patiënt na behandeling. De aanvrager stelt dat uitscheiding van vrije vectordeeltjes in zeldzame gevallen en lage hoeveelheden is waargenomen in klinische studies waarbij de vector direct aan de patiënt ingespoten wordt. De aanvrager doet geen uitspraak over uitscheiding bij de *ex vivo* methodiek die gehanteerd wordt bij deze klinische studie, echter de kans hierop is klein omdat de vrije vectordeeltjes snel geïnactiveerd worden na toediening (gezien de inactivatie door het complementsysteem en de halfwaardetijd). Wanneer onbedoelde blootstelling van derden aan vrije SIN lentivirale VSV-G gepseudotypeerde vectordeeltjes plaatsvindt, zal de hoeveelheid aanwezige vectordeeltjes snel afnemen; complementeiwitten in het bloed van de ontvanger zorgen voor inactivatie van de vectordeeltjes en daarnaast zorgt de halfwaardetijd van de vectoren voor een snelle afname van de vectordeeltjes.^{31,32}

De laatste jaren zijn er veel klinische studies met lentivirale vectoren uitgevoerd met T-cellen en ook met CD34+ hematopoïetische stamcellen.⁴⁰ Hierbij zijn er zover bekend nooit 'adverse effects' ten gevolge van de aanwezigheid van lentivirale vectordeeltjes, of gevallen van leukemie gerapporteerd.^{41,42} Er kan echter niet volledig uitgesloten worden dat de vrije vectordeeltjes bij onbedoelde blootstelling cellen kunnen transduceren. Hoewel er geen aanwijzingen zijn dat dit negatieve effecten heeft voor de onbedoelde ontvanger, is het onwenselijk dat derden worden blootgesteld aan vrije lentivirale partikels. De COGEM wijst daarom op het belang dat er zorgvuldig gewerkt wordt voor, tijdens en na de toediening van het medische product, om de kans op onbedoelde blootstelling te beperken.

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's van de aanwezigheid van vrije SIN lentivirale VSV-G gepseudotypeerde vectordeeltjes verwaarloosbaar klein is.

3.5. Effecten van de mogelijke blootstelling van het milieu aan de getransduceerde CD34+ cellen

Hematopoïetische stamcellen (CD34+) zijn voorlopercellen van T- of B-cellen. Bij behandeling met gg-CD34+ stamcellen zullen de gg-cellen zich vestigen in het beenmerg van de patiënt, waarna deze

zich zullen ontwikkelen tot gg-immuuncellen (gg-B-cellen en gg-T-cellen), die eveneens de functionele kopie van het *RAG1* of *RAG2* gen bij zich dragen.

Genetisch gemodificeerde bloedcellen kunnen zich buiten het lichaam niet handhaven, en bovendien is de kans op aanwezigheid van bloedcellen in urine, feces of andere lichaamsvloeistoffen zeer klein. Overdracht van gg-bloedcellen vanuit de patiënt naar andere personen kan plaatsvinden door prikincidenten, donatie van weefsels/organen of bloed, overdracht via de placenta (naar ongeboren kind), via moedermelk, of via het semen (seksueel contact).⁴³ Recent heeft de COGEM een onderzoek laten uitvoeren naar de potentiële overdracht van gg-T-cellen naar derden en de mogelijke effecten waarmee dit gepaard kan gaan.⁴³ Uit studies blijkt dat getransduceerde T-cellen maanden of zelfs jaren na toediening nog gedetecteerd kunnen worden in patiënten.^{44,45,46,47,48,49,50} In een enkele studie zijn 11 jaar na toediening nog gg-T-cellen ontdekt, met een geschatte halfwaardetijd van meer dan 16 jaar.⁵¹ De COGEM acht het aannemelijk dat gg-CD34+ cellen, en de daaruit ontwikkelde gg-B- en T-cellen na toediening langere tijd (meerdere jaren) kunnen persisteren in het lichaam.

Op basis van de informatie uit het onderzoeksrapport en de wetenschappelijke literatuur signaleerde de COGEM dat overdracht van gg-T-cellen na gg-T-cel therapie in specifieke gevallen een potentieel risico voor derden kan vormen.⁵² Bij overdracht via prikincidenten, semen en bloeddonatie is het verwachte effect verwaarloosbaar klein omdat overgedragen gg-T-cellen door het afweersysteem van de ontvanger vernietigd zullen worden. Bij overdracht via weefsel/orgaan/stamceldonatie, borstvoeding of de placenta kan niet uitgesloten worden dat gg-T-cellen een schadelijk effect kunnen veroorzaken in de ontvanger, maar dit is mede afhankelijk van de specifieke modificaties die aangebracht zijn in de genetisch gemodificeerde cel.

In het aanvraagformulier is aangegeven dat patiënten die deelnemen aan de studie wordt afgeraden om bloed, bloedproducten, organen, weefsels en cellen voor (hematopoëtische stamcel)transplantatie te doneren gedurende het leven van de patiënt. De aanvrager geeft aan dat de behandeling op jonge leeftijd plaatsvindt, maar dat de patiënten op volwassen leeftijd nog gg-immuuncellen bij zich kunnen dragen die via borstvoeding overgedragen kunnen worden. De aanvrager geeft daarom in het aanvraagformulier aan dat vrouwelijke patiënten geen borstvoeding dienen te geven. De COGEM merkt op dat transmissie van bloedcellen ook via de placenta kan plaatsvinden. De CD34+ en de daaruit gedifferentieerde T- en B-lymfocyten brengen echter geen specifieke (of chimere) antigeenreceptor tot expressie, en vormen geen gerichte immuunreactie tegen bepaalde antigenen (aanwezig op lichaamseigen cellen) die potentieel schadelijk zou kunnen zijn voor het (ongeboren) kind of ontvangers van bloed/weefsels/organen/moedermelk.

Omdat het therapeutische doelwit in de onderhavige vergunningaanvraag een correctie van een slecht-functionerend gen betreft, en het een lichaamseigen gen is waarbij geen schadelijke effecten worden verwacht bij expressie hiervan, acht de COGEM het milieurisico van blootstelling van derden aan de gg-CD34+ of hieruit ontstane gg-T- of B-cellen in de onderhavige aanvraag verwaarloosbaar klein.

4. Conclusie

De aanvrager is van plan een klinische studie uit te voeren waarin lentiviraal getransduceerde CD34+cellen worden gebruikt die voorzien zijn van een goedwerkend *RAG1* of *RAG2* gen, waardoor verwacht wordt dat de blokkade tot B- of T-cel differentiatie opgeheven wordt en de immuunfunctie van de *RAG1*-SCID en *RAG2*-SCID patiënten hersteld wordt. Risico's die hierbij kunnen optreden, hebben betrekking op de eventuele vorming en de verspreiding van RCL of recombinant virus, de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes in het toe te dienen product, en de effecten van de mogelijke verspreiding van de getransduceerde CD34+ cellen in het milieu.

Op basis van de aangeleverde informatie acht de COGEM de moleculaire karakterisering afdoende. Daarnaast beschouwt zij de kans op de aanwezigheid van RCL of recombinant virus in het *RAG1* of *RAG2* celproduct verwaarloosbaar klein. Uit de COGEM formule om het aantal vrije vectordeeltjes in te schatten, blijkt dat er infectieuze vrije vectordeeltjes aanwezig zullen zijn in het medische product. De COGEM acht de kans op blootstelling van derden aan vrije vectordeeltjes uit het medische product bij zorgvuldige toediening zeer klein. Aangezien de kans op negatieve effecten ten gevolge van insertionele mutagenese bij lentivirale vectoren nooit aangetoond is, de aanwezigheid van vectordeeltjes snel afneemt door blootstelling aan complementeiwitten, en vanwege de halfwaardetijd van de vector, en het onschadelijke karakter van het *RAG1/2* genproduct, is de COGEM van oordeel dat het risico hiervan verwaarloosbaar klein is. De COGEM is daarom van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. COGEM (2019). Klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen (JNJ-68284528) tegen B-cel maligniteiten. COGEM advies CGM/190624-03
2. COGEM (2018). Klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen (JCAR017) tegen B-cel maligniteiten (Princes Máxima Centrum). COGEM advies CGM/181231-01
3. COGEM (2018). Klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen (JCAR017) tegen B-cel maligniteiten. COGEM advies CGM/180612-01
4. COGEM (2018). Klinische studie met retroviraal getransduceerde T-cellen tegen hematologische maligniteiten. COGEM advies CGM/180103-02
5. COGEM (2017). Klinische studie met TEG001 ter behandeling van hematologische en solide tumoren. COGEM advies CGM/171013-02
6. COGEM (2016). Klinische studie met getransduceerde T-cellen tegen B-cel maligniteiten. COGEM advies CGM/161130-01
7. COGEM (2016). Klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen tegen B-cel maligniteiten. COGEM advies CGM/160229-01
8. COGEM (2018). Klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen (KITE-585) tegen B-cel maligniteiten. COGEM advies CGM/181206-01
9. Pike-Overzet K *et al.* (2011). Correction of murine Rag1 deficiency by self-inactivating lentiviral vector-mediated gene transfer. *Leukemia*, 25: 1471-1483

10. Gennery A (2019). Recent advances in understanding RAG deficiencies. *F1000Res.* 8. pii: F1000 Faculty Rev-148.
11. Villa A & Notarangelo LD (2019). RAG gene defects at the verge of immunodeficiency and immune dysregulation. *Immunol. Rev.* 287: 73-90
12. Werkboek Kinderimmunologie (2014). Sectie Pediatriche Infectieziekten en Immunologie van de Nederlandse Vereniging voor Kindergeneeskunde. Ed. Kneepkens CMF, VU University Press, Amsterdam. http://www.kindergeneeskunde-mca.nl/images/stories/medische_protocollen/werkboek_immunologie.pdf (bezocht: 2 juli 2019)
13. Freed EO & Martin MA (2013), Human Immunodeficient Viruses: Replication. In: *Fields virology*, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM et al. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
14. Cockrell AS & Kafri T (2007). Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol. Biotechnol.* 36: 184-204
15. Zufferey R *et al.* (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.* 72: 9873-9880
16. Miyoshi H *et al.* (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J. Virol.* 72: 8150-8157
17. COGEM (2013). Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing. COGEM advies CGM/130227-05
18. 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
19. Cornetta K *et al.* (2018). Absence of replication competent lentivirus in the clinic: analysis of infused T cell products. *Mol Ther.* 26: 280-288
20. Holzinger A *et al.* (2016). The growing world of CAR T cell trials: a systematic review. *Cancer Immunol. Immunother.* 65: 1433-1450
21. Naldini L *et al.* (2016). Lentiviral vectors, two decades later. *Science.* 353: 1101-1102
22. Cornetta K *et al.* (2011). Replication-competent lentivirus analysis of clinical grade vector products. *Mol. Ther.* 19: 557-566
23. Grunwald TFS *et al.* (2004). Reducing mobilization of simian immunodeficiency virus based vectors by primer complementation. *J. Gene Med.* 6:147-154.
24. Hanawa H *et al.* (2005). Mobilization and mechanism of transcription of integrated self-inactivating lentiviral vectors. *J. Virol.* 79: 8410-8421
25. Wayne J *et al.* (1994). A regulatory role for recombinase activating genes, RAG-1 and RAG-2, in T cell development. *Immunity.* 1: 95-107
26. Lander ES *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921
27. Dewannieux M & Heidmann T (2013). Endogenous retroviruses: acquisition, amplification and taming of genome invaders. *Curr. Opin. Virol.* 3: 646-656
28. Villesen P *et al.* (2004). Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome. *Retrovirology* 1: 32-44
29. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. COGEM advies CGM/090331-03
30. COGEM (2018). Vervolgadvies over vrije virusdeeltjes in klinische studie gg-T-cellen JCAR017 tegen B-cel maligniteiten. COGEM advies CGM/180702-01

31. DePolo NJ *et al.* (2000). VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol Ther.* 2: 218-222
32. Higashikawa F & Chang L (2001). Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology*. 280: 124-131
33. Schlimgen R *et al.* (2016). Risks associated with lentiviral vector exposures and prevention strategies. *J. Occup. Environ. Med.* 58: 1159-1166
34. Cattoglio C *et al.* (2010). High-definition mapping of retroviral integration sites identifies active regulatory elements in human multipotent hematopoietic progenitors. *Blood*. 116: 5507-5517
35. Cesani M *et al.* (2015). Shedding of clinical-grade lentiviral vectors is not detected in a gene therapy setting. *Gene Ther.* 22: 496-502
36. Baum C *et al.* (2003). Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood*. 101: 2099-2114
37. Hahn WC & Weinberg RA (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2: 331-341
38. Turka LA *et al.* (1991). Thymocyte expression of RAG-1 and RAG-2: termination by T cell receptor cross-linking. *Science*. 253: 778-781
39. Wilson A *et al.* (1994). Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes. *J. Exp. Med.* 179: 1355-1360
40. ClinicalTrials.gov. U.S. National Library of Medicine.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=CD34%2B%2C+lentiviral&cntry=&state=&city=&dist=> (bezoekt: 3 juli 2019)
41. Han EQ *et al.* (2013). Chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy: progress and challenges. *J. Hematol. Oncol.* 6: 47
42. Oldham RA *et al.* (2015). Lentiviral vectors in cancer immunotherapy. *Immunotherapy*. 7: 271-284
43. Bergmans H *et al.* (2018). Milieurisicoanalyse van klinische toepassingen van genetisch gemodificeerde T-cellen. COGEM onderzoeksrapport 2018-5
44. Morgan RA *et al.* (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314: 126-129
45. Porter DL *et al.* (2011). Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 365: 725-733
46. Kalos M *et al.* (2011). T Cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci. Transl. Med.* 3: 95ra73
47. Maude SL *et al.* (2014). Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N. Engl. J. Med.* 371: 1507-1517
48. Oliveira G *et al.* (2015). Tracking genetically engineered lymphocytes long-term reveals the dynamics of T cell immunological memory. *Sci. Transl. Med.* 7: 317ra198.
49. Walker RE *et al.* (2000). Long-term in vivo survival of receptor-modified syngeneic T cells in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood* 96: 467-474

50. Mitsuyasu RT *et al.* (2000). Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects . *Blood* 96: 785-793
51. Scholler J *et al.* (2012). Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Sci. Transl. Med.* 4: 132ra53
52. COGEM (2019). Immunotherapie met genetisch gemodificeerde T-cellen: onbedoelde blootstelling en potentiële risico's. COGEM signalering CGM/190227-01